

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID



**Linfangiopatía intestinal en la colestasis extrahepática
microquirúrgica experimental**

TESIS DOCTORAL

Luis Tresierra Carranza

Madrid 2015

A mi familia.

A Alba.

A todos los que me enseñaron.

Quiero expresar mi agradecimiento a las siguientes personas e instituciones, sin las cuáles este trabajo no hubiera sido posible:

- Al Profesor Dr. Jaime Arias, del que tanto he aprendido en relación a modelos experimentales de insuficiencia hepática e inflamación, y por su estímulo constante.
- A la Profesora Dra. María Ángeles Aller Reyero por su aporte, conocimiento y ayuda en la elaboración de este proyecto.
- A Salvador Argudo y Carlos Gilsanz por su ayuda con la técnica quirúrgica y con el seguimiento de los animales.
- Al equipo de Ingeniería Celular del Hospital Universitario de La Paz, en especial a Sherezade Fuentes y Alejandro Blázquez, que han desarrollado un enorme trabajo con el aislamiento y cultivo de las células madre.
- Al Servicio de Cirugía Experimental del Hospital Universitario de La Paz. A la Dra. Carlota Largo (Dr. en Veterinaria) y a Pedro, Pablo e Isabel, auxiliares del animalario, que me instruyeron y ayudaron en el manejo y cuidado de los animales de experimentación.
- Al Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia de la Universidad Autónoma de Madrid, en especial a Carmen Sánchez por su aportación en el procesamiento de muestras para su posterior estudio histológico.
- A mis directores de Tesis, las Dr. Luis Santamaría Solís y Dra. Isabel Prieto Nieto, por su gran dedicación, capacidad de trabajo y su paciencia.
- A la Fundación Mutua Madrileña, por su aportación económica a través de la concesión de una beca destinada a la financiación de este proyecto (FMM- Ref. No. PA 6977/2009 and AP 105502012).

Índice de abreviaturas y Acrónimos

A

ACLF: *"Acute-on-chronic liver failure"* (Insuficiencia hepática aguda sobre crónica)

ADSC: *"Adipocyte derived stem cells"* (células madre derivadas de adipocitos)

ANOVA: Análisis de varianza

ALT: Alanin aminotransferasa

AST: Aspartato aminotransferasa

B

BM-MSCs: *"Bone marrow mesenchymal stem cells"* (células madre mesenquimales derivadas de la medula ósea)

C

CCl₄: Tetracloruro de carbón

CM: Colestasis microquirúrgica

CMX: Colestasis microquirúrgica que recibieron xenotrasplante hepático de células madre mesenquimales de origen adipocítico

CTGF: *"Connective tissue growth factor"* (factor de crecimiento del tejido conectivo)

D

D: Duodeno

DE: Desviación estándar

dvm: Diámetro vascular medio

E

ECM: *"Extracellular matrix"* (matriz extracelular)

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGF: *"Epithelial growth factor"* (factor de crecimiento epitelial)

Elisa: Enzyme-linked immunosorbent assay

eNOS: Óxido nítrico sintetasa del endotelio

ERi: circulación colateral esplenorrenal inferior

ERs: circulación colateral esplenorrenal superior

ES: Estadísticamente significativo

F

FBS: *"Fetal bovine serum"* (suero bovino fetal)

FA: Fosfatasa alcalina

G

GAGs: Glicosaminoglicanos

GGT: γ -glutamyltransferasa

H

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

HGF: "Hepatocyte growth factor" (factor de crecimiento hepatocitario)

I

ICAM-1: Molécula de adhesión leucocitaria – 1

IGF-1: "Insulin-like growth factor" (factor de crecimiento similar a Insulina)

IFN- γ : Interferon gamma

IL: Interleuquinas

I: Íleon

iNOS: Óxido nítrico sintetasa inducible

L

LBP: "Lypopolysacharide-binding proteína" (proteína de unión a lipopolisacárido)

LC: Lóbulo caudado hepático

LDH: Lactato deshidrogenasa

LLD: Lóbulo lateral derecho hepático

LLI: Lóbulo lateral izquierdo hepático

LM: Lóbulo medio hepático

LPS: Lipopolisacarido

LYVE-1: Receptor de la hialuronidasa de los vasos linfáticos

L_v: Densidad de longitud de los vasos linfáticos

M

MCP: "Monocyte chemoattractant protein" (proteína quimioatrayente de monocitos)

MCp: Progenitores de mastocitos

MIF: "Macrophage induction factor" (factor inductor de macrófagos)

MMP: Metaloproteasas de la matriz

N

NASH: "Nonalcoholic steatohepatitis" (esteatohepatitis no alcohólica)

NF- α faB/IkBaI α fa: Complejo regulador transcripcional de NF α faB

NF- κ B: Factor de transcripción Nuclear kappa B

NK cells: Células asesinas naturales

NO: Óxido nítrico

P

PAF: "Platelet activation factor" (factor activador de plaquetas)

PBS: "Phosphate-buffered saline" (tampón fosfato salino)

PCI: Peso corporal inicial

PCF: Peso corporal final

PDGF: "Platelet-derived growth factor" (factor de crecimiento derivado de plaquetas)

PE: Peso esplénico

PE/PC: Relación peso esplénico / peso corporal

PH: Peso hepático

PH/PC: Relación peso hepático peso corporal

PSO: Pseudo-operado

PT: Peso testicular

PT/PC: Relación peso testicular / peso corporal

S

SCF: "Stem cell factor" (factor de células madre)

T

TIMP-1: "Tissue inhibitor of Metalloproteinases" (inhibidor tisular de metaloproteinasas)

TGF: "Transforming growth factor" (factor transformador de crecimiento)

TLR: "Toll-like receptor" (receptores tipo Toll)

TNF: "Tumoral necrosis factor" (factor de necrosis tumoral)

V

VCAM: Molécula de adhesión celular vascular

VEGF: "Vascular endothelial growth factor" (factor de crecimiento de endotelio vascular)

VEGFR: "Vascular endothelial growth factor receptor" (receptor del factor de crecimiento de endotelio vascular)

V_v *vasc*: *Fracción de volumen ocupada por los vasos linfáticos*

Y

Y : *Yeyuno*

INDICE GENERAL

I. INTRODUCCION	1
1. COLESTASIS EXTRAHEPATICA Y RESPUESTA INFLAMATORIA	2
2. MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA COLESTASIS EXTRAHEPATICA	6
3. ALTERACIONES FISIOPATOLOGICAS EN LA COLESTASIS EXTRAHEPATICA EXPERIMENTAL	10
4. PATOLOGIA VASCULAR INTESTINAL LINFATICA EN LA INFLAMACION CRONICA	27
II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	30
1. HIPOTESIS	31
2. OBJETIVOS	32
III. MATERIAL Y METODOS	33
1. MATERIAL	34
1.A. ANIMALES	34
1.B. INSTALACIONES	34
1.B.1. ANIMALARIO	34
1.B.2. UNIDAD MICROQUIRURGICA	34
1.B.3. LABORATORIO DE INGENIERIA CELULAR	35
1.B.4. SALA DE EVOLUCION POSTOPERATORIA	35
1.B.5. SALA DE SACRIFICIO Y PROCESADO DE MUESTRAS	35
1.B.6. AREA DE CONSERVACION DE MUESTRAS	36
1.B.7. ELIMINACION DE RESIDUOS BIOLOGICOS	36
1.C. FARMACOS	36
1.C.1. ANESTESICOS	36
1.C.2. OTROS FARMACOS	36
1.D. MATERIAL	37
1.D.1. INSTRUMENTAL QUIRURGICO	37
1.D.1.a. PINZAS	37
1.D.1.b. TIJERAS	37
1.D.2. MATERIA DE SUTURA Y LIGADURA	37
1.D.3. MATERIAL QUIRURGICO COMPLEMENTARIO	38
1.D.4. OTROS MATERIALES PARA EL PROCEDIMIENTO OPERATORIO Y LA EXTRACCION DE MUESTRAS	38
1.E. LABORATORIO DE HISTOLOGIA	39
1.F. ANESTESIA	39

1.G. REACTIVO	39
2. METODOS	39
2.A. CONDICIONES DE ESTABULACION Y UTILIZACION DE LOS ANIMALES.....	39
2.B. DISEÑO EXPERIMENTAL	40
2.C. TECNICA ANESTESICA	40
2.D. TECNICAS QUIRURGICAS	41
2.D.1. PSEUDO-OPERACIÓN	41
2.D.2. COLESTASIS EXTRAHEPATICA MICROQUIRURGICA	43
2.E. OBTECCION DE CELULAS MADRE DE LIPOASPIRADO HUMANO	47
2.E.1. CARACTERIZACION CELULAR MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO	48
2.E.2. CARACTERIZACION CELULAR FUNCIONAL MEDIANTE DIFERENCIACION	49
2.E.3. DIFERENCIACION IN VITRO DE LAS CELULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE ADIPOCITOS EN CELULAS PROGENITORAS HEPATOCITARIAS	50
2.E.4. ADMINISTRACION INTRAHEPATICA DE CELULAS MADRE MESENQUIMALES DE ORIGEN ADIPOCITICO	50
2.F. MANTENIMIENTO Y TRATAMIENTO POSTOPERATORIA	51
2.G. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES	53
2.G.1. CUANTIFICACION DEL LIQUIDO ASCITICO	53
2.G.2. CIRCULACION COLATERAL PORTOSISTEMICA	53
2.G.3. VASCULOPATIA VENOSA MESENTERICA	54
2.H. ELIMINACION DE RESTOS BIOLOGICOS	56
2.I. ESTUDIO MICROSCOPICO E HISTOPATOLOGICO	56
2.I.1. FIJACION Y TALLADO DE LAS PIEZAS	56
2.I.2. INCLUSION	56
2.I.3. PROCESADO DE LOS CORTES	57
2.I.3.a. INMUNOHISTOQUIMICA	57
2.I.4. METODOS CUANTITATIVOS	59
2.I.4.a. BREVES CONSIDERACIONES TEORICAS ACERCA DE LA CUANTIFICACION ESTEREOLOGICA	59
2.I.4.b. ESTIMACION DE PARAMETROS ESTEREOLOGICOS DE LOS VASOS LINFATICOS INTESTINALES	

INMUNOTEÑIDOS CON LYVE-1	61
2.I.5. ANALISIS ESTADISTICO	63
IV. RESULTADOS	66
1. SUPERVIVENCIA	67
2. COMPLICACIONES POST-OPERATORIAS	67
3. ASCITIS	68
4. CIRCULACION COLATERAL PORTO-SISTEMICA	68
5. VASCULOPATIA VENOSA MESENTERICA	69
6. EVOLUCION DEL PESO CORPORAL	69
7. PESO HEPATICO	71
8. PESO ESPLENICO	73
9. PESO TESTICULAR	74
10. VASOS LINFATICOS	76
10.1. DENSIDAD DE LONGITUD	78
10.2. FRACCION DE VOLUMEN	82
10.3. DIAMETRO VASCULAR MEDIO	85
V. DISCUSION	91
VI. CONCLUSIONES	105
VII. BIBLIOGRAFIA	107

I. INTRODUCCION

1. COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA Y RESPUESTA INFLAMATORIA

La colestasis se define como la obstrucción al flujo biliar. El déficit total o parcial de drenaje biliar hacia el duodeno produce colestasis (Gossard 2013) y se clasifica en extrahepática e intrahepática (Sherlock 1989). La causa de la colestasis intrahepática reside en el hígado en tanto que el término extrahepático implica la obstrucción de la vía biliar fuera del parénquima hepático (Sherlock 1989; Li y Crawford 2004). Los principales síntomas y signos de las colestasis intrahepáticas y extrahepáticas son similares. En particular la ictericia y el prurito son características clínicas de ambos tipos de colestasis, si bien es frecuente que las alteraciones bioquímicas plasmáticas precedan su instauración (Gossard 2013). Para realizar el diagnóstico diferencial entre las colestasis intra- y extra-hepáticas es precisa una cuidadosa evaluación de sus características clínicas, serológicas e histopatológicas (Sherlock 1989; Li y Crawford 2004; Gossard 2013).

Respecto a las colestasis extrahepáticas su causa es la obstrucción mecánica de los grandes conductos biliares, como son en el humano, los conductos hepáticos derecho e izquierdo, el conducto hepático común y el conducto colédoco (Schaffner y Popper 1979; Sherlock 1989). Dicha obstrucción puede ser causada a su vez por malformaciones biliares (Nakamura y Tanoue 2013), litiasis (Li y Crawford 2004; Hirschfield y cols., 2010), tumores biliares (Hirschfield y cols., 2010) o compresión extrínseca de la vía biliar (Suarez y cols., 2013) (Tabla 1). Con independencia de su etiología, la colestasis extrahepática se manifiesta clínicamente por ictericia, coluria, acolia y prurito (Schaffner y Popper 1979; Sherlock 1989; Gossard 2013). Las alteraciones bioquímicas se relacionan principalmente con la retención sanguínea de todas las sustancias normalmente excretadas en la bilis (Sherlock 1989). Al incremento sérico de bilirrubina y ácidos biliares se asocian elevadas concentraciones séricas de fosfatasa alcalina, γ -glutamyl transferasa y colesterol (Li y Crawford 2004).

ETIOLOGIA DE LA COLESTASIS EXTRAHEPATICA

- Atresia biliar extrahepática
- Litiasis biliar
- Lesiones inflamatorias
 - Colangitis esclerosante primaria y secundaria
 - Estenosis postoperatorias
 - Colédoco
 - Esfínter de Odi
 - Biliopatía hipertensiva portal por obstrucción extrahepática de la vena porta
 - Pancreatitis
 - Aguda
 - Crónica
 - Pseudoquistes pancreáticos
- Tumores
 - Intrínsecos
 - Benignos – Papiloma
 - Malignos – Colangiocarcinoma
 - Extrínsecos
 - Pancreáticos
 - Gástricos
 - Metástasis ganglionares hiliares hepáticas
 - Linfomas – Enfermedad de Hodgkin
- Causas inusuales
 - Quistes de colédoco
 - Abscesos amebianos
 - Divertículos duodenales
 - Infecciones parasitarias: Ascariasis, Fascioliasis
 - Hemobilia

Tabla 1. Etiología de la colestasis extrahepática.

La inflamación hepática es una característica importante de la colestasis extrahepática. Entre las alteraciones inflamatorias hepáticas de la colestasis obstructiva destaca el edema con infiltración leucocitaria de los tractos portales y la proliferación de las

células epiteliales biliares con fibrosis portal (Schaffner y Popper 1979; Saito y Maher 2000; Tacke y cols., 2009). En particular, el término fibrosis biliar, define un patrón hepático consistente en la asociación de proliferación ductular biliar y de los miofibroblastos periductulares entre las áreas portal y hepatocitaria o parenquimatosa que causa el desarrollo de septos fibrosos porto-portales (Parola y Pinzani 2009). Por último, la inflamación hepática crónica secundaria a la colestasis extrahepática predispone a la tumorigénesis (Aller y cols., 2010a; Pinzani y cols., 2011).

Los colangiocitos constituyen el epitelio biliar y representan un sistema defensivo contra sustancias extrañas (Chuang y cols., 2009). En respuesta a la agresión, los colangiocitos liberan mediadores inflamatorios y expresan moléculas de adhesión que facilitan el reclutamiento, localización y modulación de la respuesta inmunitaria en el tracto biliar y en el hígado (Syal y cols., 2012). A su vez, los mediadores inflamatorios modulan la función y supervivencia de los colangiocitos, favoreciendo tanto su proliferación como la diferenciación de los fibroblastos portales y células estrelladas hepáticas en miofibroblastos, lo que explicaría la concomitante respuesta proliferativa biliar y fibrosante en la fibrosis/cirrosis biliar (Reynoso-Paz y cols., 1999; Syal y cols., 2012).

Las interacciones epitelio-mesenquimales desempeñan una importante influencia en la evolución de las colangiopatías crónicas. Incluso se ha sugerido que los colangiocitos como los hepatocitos, pueden transformarse en células mesenquimales mediante un proceso de transición epitelio-mesenquimal en cuyo caso este proceso podría también contribuir a la generación de miofibroblastos y, por tanto, a la producción de fibrosis biliar (Park 2012).

Se podría concluir que la colestasis extrahepática, comparte con otros tipos de colangiopatías la existencia de proliferación biliar, ductopenia por inhibición de la proliferación o por apoptosis, fibrosis biliar y carcinogénesis (Park 2012; Syal y cols., 2012).

Una complicación frecuente de la colestasis extrahepática es la infección bacteriana con colangitis y posterior formación de abscesos. Charcot describió en 1877 la triada clínica de fiebre, ictericia y dolor en el hipocondrio derecho que se asocia a la colangitis secundaria a litiasis o estenosis del colédoco (Lipsett y Pitt 1990). En 1959 Reynolds y Dargan describen una grave evolución de colangitis que cursa con shock séptico y obnubilación (Reynolds y Dargan 1959). Aunque se ha utilizado también el término “colangitis supurativa”, no todos los pacientes con bilis purulenta presentan shock séptico, ni todos los pacientes con los tipos evolutivos más graves de colangitis presentan pus en los conductos biliares (Lipsett y Pitt 1990).

Otra grave consecuencia de la colestasis extrahepática en particular cuando se

cronifica, es la hipertensión portal. Las complicaciones clínicamente significativas de la hipertensión portal, se considera que se producen cuando el gradiente de presión venosa hepática es superior a 10 mmHg (Miñano y García-Tsao 2010). Entre estas complicaciones destacan la encefalopatía hepática, la ascitis, el síndrome hepatorenal y las varices gastroesofágicas que son causa de hemorragia, así como de una creciente mortalidad con cada episodio hemorrágico (Rahimi y Rockey 2011).

Las infecciones bacterianas son frecuentes en los pacientes con insuficiencia hepática crónica con independencia de su etiología. Las infecciones más frecuentes son la peritonitis bacteriana espontánea, las infecciones urinarias y la neumonía, que en el 80% de los casos son causadas por bacilos gram-negativos y, en particular, por *Escherichia coli*, lo que sugiere que estos episodios infecciosos que sufren los pacientes con insuficiencia hepática crónica son de origen entérico (Bellot y cols., 2013). El paso de bacterias viables desde la luz intestinal, a través de su pared, hasta los ganglios linfáticos mesentéricos y otros tejidos y órganos de la economía, es un mecanismo patogénico aceptado para explicar el desarrollo de las infecciones bacterianas en el paciente con insuficiencia hepática crónica y, por tanto, en los pacientes con colestasis extrahepática. Este fenómeno ha sido originalmente descrito por Berg y Garlington en 1979 (Berg y Garlington 1979). Los mecanismos que favorecen la translocación bacteriana intestinal son, al menos, tres: el excesivo crecimiento de las bacterias intestinales, ya sean normales o anormales, el incremento de la permeabilidad intestinal y las alteraciones inmunológicas que se asocian a la insuficiencia hepática crónica, las cuales incluyen el deficitario sistema inmunológico intestinal constituido por el tejido linfoide asociado al intestino que está compuesto por las placas de Peyer, los linfocitos y células dendríticas de la lámina propia, los linfocitos intraepiteliales y los ganglios linfáticos mesentéricos (Bellot y cols., 2013). Por último, la insuficiencia hepática crónica se asocia con una significativa disminución de la actividad del sistema retículo endotelial hepático, tanto por la existencia de circulación colateral portosistémica, que evita el tránsito del flujo portal por el hígado, como por la reducida capacidad para la fagocitosis de las células de Kupffer (Rimola y cols., 1984).

Sin embargo, la alteración más representativa de la afectación hepática crónica, incluyendo la secundaria a colestasis extrahepática, es la existencia de circulación hiperdinámica tanto esplácnica como sistémica. La circulación hiperdinámica se atribuye tanto al incremento de sustancias vasodilatadoras circulantes como a una reducida respuesta a sustancias vasoconstrictoras (Newby y Hayes 2002; Iwakiri y Groszmann 2006). En esencia, las alteraciones hemodinámicas asociadas a la insuficiencia hepática crónica, hipertensión

portal y translocación bacteriana, sugieren la existencia de un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica de origen multifactorial (Aller y cols., 2007a; Thabut y cols., 2007; Tandon y García-Tsao 2008; Cazzaniga y cols., 2009; Abdel-Khalek y cols., 2011). En este caso las complicaciones propias de la colestasis extrahepática, tanto locales o hepáticas (fibrosis/cirrosis biliar), regionales o esplánicas (hipertensión portal, circulación colateral portosistémica, translocación bacteriana intestinal, ascitis) y generales o sistémicas (encefalopatía hepática, síndrome hepatorenal) por su naturaleza inflamatoria, podrían ser integradas para su estudio etiopatogénico y, por tanto, en la investigación de nuevas y más eficaces tratamientos.

2. MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA

La colestasis extrahepática cursa con una elevada incidencia de morbilidad y mortalidad (Poupon y cols., 2000). Las graves alteraciones hepáticas, esplánicas y sistémicas que produce la ictericia obstructiva, justifica la creación de modelos experimentales que permitan el estudio de sus mecanismos patogénicos con el objetivo de instaurar eficaces medidas profilácticas y terapéuticas (Aller y cols., 2008a).

El modelo experimental más frecuentemente utilizado de ictericia obstructiva es el resultante de la ligadura y sección del colédoco en la rata, aunque también se ha desarrollado en conejos y ratones (Katsuta y cols., 2005; Abraldes y Garcia-Pagan 2006). Este modelo se considera que cursa con hipertensión portal sinusoidal (Abraldes y Garcia-Pagan 2006). La rata es el animal de elección ya que no posee vesícula biliar, en tanto que en el ratón, la oclusión del colédoco produce una gran dilatación de la vesícula biliar que puede causar su perforación y coleperitoneo (Abraldes y Garcia-Pagan 2006), lo que exige ligadura del conducto cístico o bien colecistectomía previa a la colestasis (Aller y cols., 2008a). La técnica quirúrgica de ligadura y sección del colédoco es sencilla. Se trata de una técnica macroquirúrgica, ya que no requiere medios de magnificación para su realización. En esencia, y tras laparotomía media o subcostal derecha, se disecciona el colédoco y se reseca entre dos ligaduras. Sin embargo, las ratas con colestasis extrahepática macroquirúrgica desarrollan un pseudoquistes biliar por dilatación del extremo proximal ligado del colédoco, que se infecta por microorganismos Gram-negativos y los animales fallecen durante las dos primeras semanas de evolución postoperatoria por sepsis secundaria a la existencia de múltiples abscesos intraperitoneales, hepáticos y pulmonares (Aller y cols., 1993; Aller y cols., 2004a; Aller y cols., 2009a). En este modelo experimental también se ha descrito el desarrollo de

fibrosis biliar por lo que ha sido considerado apropiado para el estudio de la patología humana secundaria a la atresia biliar extrahepática y la colangitis esclerosante primaria (Hayashi y Sakai 2011; Petersen 2012).

En el ratón, la transección del conducto colédoco entre ligaduras, asociado a colecistectomía, también permite conseguir un modelo para el estudio de la fibrosis biliar, aunque coexiste una extensa necrosis hepática (Heinrich y cols., 2011). Para evitar la grave lesión hepática se ha propuesto la realización de una ligadura parcial del colédoco. Esta técnica consiste en la ligadura conjunta del colédoco y una aguja quirúrgica de 7-0. Posteriormente, se retira la aguja y así persiste una estenosis graduada del colédoco que produce a los 14 días de evolución, proliferación biliar pero evita la necrosis del parénquima hepático (Heinrich y cols., 2011).

La técnica microquirúrgica de colestasis extrahepática en la rata permite la resección de la vía biliar extrahepática que incluye el colédoco, hasta el inicio de su porción intrapancreática, en continuidad con los conductos biliares que drenan cada uno de los lóbulos hepáticos (Aller y cols., 1993; Lorente y cols., 1995; Aller y cols., 2009a; Aller y cols., 2009b; Aller y cols., 2010a). Con ésta técnica microquirúrgica la inexistencia de vía biliar extrahepática residual previene la formación de pseudoquistes biliares hiliares, así como de abscesos abdomino-torácicos y reduce la mortalidad respecto al modelo clásico de ligadura y sección del colédoco (Aller y cols., 1993; Aller y cols., 2004a; Aller y cols., 2009a; Aller y cols., 2009b; Aller y cols., 2010a).

Este modelo de colestasis extrahepática microquirúrgica, al conseguir mayor supervivencia, también permite obtener a más largo plazo un nuevo modelo de fibrosis hepática que puede ser de gran utilidad para el estudio de nuevas terapias antifibrogénicas. A este respecto, se debe considerar que durante la evolución de la colestasis extrahepática en la rata existen dos fases. La fase evolutiva precoz que se extiende hasta la 4ª semana del periodo postoperatorio, y la fase evolutiva tardía que comprende las posteriores semanas de supervivencia (Assimakopoulos y Vagianos 2009). Así, cuando la ictericia obstructiva es aguda, la colemia predomina sobre la lesión del parénquima hepático y no existe aún hipertensión portal ni cirrosis, si bien se producen efectos inotrópicos y cronotrópicos negativos cardíacos (Joubert 1978; Liu y cols., 2000; Nahavandi y cols., 2001; Hajrasouliha y cols., 2004), altera la respuesta vasoconstrictora simpática (Bomzon y cols., 1985; Jacob y cols., 1993) y causa una intensa diuresis y natriuresis que pueden incluso producir grave hipovolemia (Green y Better 1995; Kramer 1997). Como consecuencia, se producen hipotensión arterial y disfunción renal prerrenal que es agravada por la endotoxemia que

acompaña a éste modelo experimental. A su vez, durante la fase evolutiva considerada crónica, esto es, superior a las cuatro semanas del postoperatorio, no solo existe colemia, endotoxemia y traslocación bacteriana intestinal (Deitch 1990; Clements y cols., 1996a; Clement y cols., 1998) sino también una significativa patología hepática con fibrosis/cirrosis biliar, hipertensión portal y ascitis (Green y Better 1995; Geerts y cols., 2008) que se asocia con una lesión renal similar fisiopatológicamente al síndrome hepatorenal de los enfermos cirróticos. Tanto las alteraciones en la fase precoz como en la fase tardía o a largo plazo, de este modelo experimental, validan su empleo para el estudio de los mecanismos fisiopatológicos de la colestasis extrahepática así como para la investigación de nuevos y más eficaces tratamientos (Assimakopoulos y Vagianos 2009).

Para la puesta a punto de la técnica microquirúrgica de la colestasis extrahepática en la rata, se ha estudiado previamente la anatomía de la vía biliar extrahepática, descrito sus variaciones anatómicas (Lorente y cols., 1995), la incidencia de infecciones postoperatorias (Aller y cols., 1993) así como se ha estandarizado una microtécnica de fácil aprendizaje y mínima mortalidad atribuible a su ejecución. El estudio del modelo experimental se ha fundamentado en la valoración de la patología hepatobiliar, con el grado de fibrosis y proliferación biliar de los hígados colestasis (Aller y cols., 2004b) y de las alteraciones bioquímicas plasmáticas propias de la lesión hepatobiliar (Aller y cols., 2008a), así como de las alteraciones del metabolismo oxidativo hepato-intestinal (López y cols, 1999) y cerebral (García-Moreno y cols., 2002) y, por último, la respuesta inflamatoria esplácnica mediante la determinación de las concentraciones de citoquinas pro y anti-inflamatorias en hígado, bazo, ganglios linfáticos mesentéricos e íleon (García-Domínguez y cols., 2010). La utilización profiláctica de antibióticos de amplio espectro (Ceftazidima 50 mg/kg) y la administración semanal de vitamina K1 (8 mg/kg i.m.) reduce la mortalidad precoz de las ratas con colestasis extrahepática (Beck y Lee 1995; Huang y cols., 2003; Akimoto y cols., 2005; Abraldes y cols., 2006). En particular, en las ratas con colestasis obstructiva microquirúrgica la supervivencia es superior a las ocho semanas y, por tanto, los resultados pueden ser más fácilmente extrapolados a la clínica humana, que se suele caracterizar por la evolución crónica de la colestasis extrahepática.

Los modelos de colestasis extrahepática, tanto macroquirúrgicos, por ligadura del colédoco, como microquirúrgicos por resección de la vía biliar extrahepática, cursan a largo plazo (4ª a 6ª semana del postoperatorio) con hepatomegalia, fibrosis biliar, infiltración leucocitaria de los espacios portales hepáticos y muerte de los hepatocitos por necrosis y apoptosis, aunque rara vez se observa la pérdida de la estructura normal hepática y, por esta

razón, no es apropiado conceptualizar estos modelos experimentales como productores de cirrosis en esta fase evolutiva (Kountouras y cols., 1984; Aller y cols., 1993; Aller y cols., 2004b).

Las alteraciones extrahepáticas son múltiples en la colestasis extrahepática experimental en la rata, con independencia de la técnica quirúrgica empleada. Destacan la ictericia, la coluria (Huang y cols., 2003; Aller y cols., 2004a), la hipertensión portal con esplenomegalia y circulación colateral portosistémica (Aller y cols., 1993; Huang y cols., 2003; Aller y cols., 2004b; Chan y cols., 2004; Katsuta y cols., 2005), la insuficiencia renal (Assimakopoulos y Vagianos 2009), la encefalopatía hepática (García-Moreno y cols., 2002; Huang y cols., 2010; Magen y cols., 2010; Assimakopoulos y cols., 2007; Eslimi y cols., 2011) y al final de este periodo considerado crónico, 6ª semana del postoperatorio, la ascitis (Huang y cols., 2003; Aller y cols., 2010a; Aller y cols., 2010b). Por lo tanto, la colestasis extrahepática experimental no solo es un modelo apropiado para el estudio de la patología hepática secundaria a la obstrucción biliar, sino que también reproduce las alteraciones esplánicas y sistémicas que son propias de la ictericia obstructiva crónica en la clínica humana.

Un modelo experimental quirúrgico de ictericia obstructiva parcial, ha sido descrito por Polimeno y cols., en 1995 (Polimeno y cols., 1995). La técnica quirúrgica consiste en la sección entre ligaduras de los conductos biliares propios de los lóbulos hepáticos medio, lateral derecho y caudado. Ya que no existe conexión entre los lóbulos hepáticos sometidos a colestasis y el lóbulo lateral izquierdo que no sufre obstrucción biliar, se puede considerar este modelo experimental para el estudio de la evolución crónica de la colestasis extrahepática en los lóbulos lateral derecho, medio y caudado. La colestasis selectiva lobular permite la supervivencia a largo plazo de los animales, aunque no evita que los lóbulos hepáticos colestásicos sufran proliferación biliar, discreta proliferación hepatocitaria e infiltración por células inflamatorias. Sin embargo, un hallazgo inesperado en éste modelo de colestasis selectiva ha sido la existencia de proliferación biliar en el lóbulo lateral izquierdo que no sufría colestasis obstructiva. Este inopinado resultado sugiere a sus autores la existencia de estimulación humoral transmitida por los lóbulos colestásicos a través de mediadores inflamatorios liberados (Polimeno y cols., 1995).

La colestasis experimental, en particular de localización extrahepática, se ha considerado un modelo apropiado para el estudio de los mecanismos implicados en la producción de atresia biliar en la clínica humana (Aller y cols., 2008b). Sin embargo, otros modelos experimentales no quirúrgicos, se han propuesto como alternativas válidas. Entre estos últimos modelos destacan los modelos de atresia biliar de etiología vírica en ratones,

mediante la inoculación intraperitoneal de varios serotipos de reovirus que inducen inflamación del hígado y de los conductos biliares con ictericia (Phillips y cols., 1969; Bangaru y cols., 1980). Asimismo, se han descrito modelos de colestasis en ratones tras inoculación de rotavirus de monos Rhesus, que causan acumulo de células asesinas naturales (NK cells) alrededor de los conductos biliares y respuesta mediada por células T, con colestasis evidente a la semana de la inoculación (Leonhardt y cols., 2010). Estos modelos de colestasis víricas tienen resultados variables dependientes del tipo de cepa animal, la dosis viral y el tiempo de infección. Un hallazgo de interés en el estudio de los mecanismos productores de colestasis víricas, ha sido la producción de ictericia a receptores inmunodeficientes por transferencia de células T procedentes de ratones con colestasis inducida por rotavirus (Lu y Mack 2009; Lu y cols., 2010).

Todos los modelos experimentales de colestasis previamente citados son realizados durante el periodo postnatal y, por esta razón, se considera que aunque permiten estudiar las consecuencias metabólicas de la colestasis y la patogenia de la colangitis, no aportan conocimiento al mecanismo productor de la atresia biliar. Por esta razón, se han desarrollado modelos prenatales, ya ligando el conducto colédoco en corderos a los 80 días de gestación (Spitz 1980) o por ligadura de la arteria hepática en conejos fetales, que produce isquemia selectiva de la vía biliar intrahepática (Morgan y cols., 1966). También se ha ensayado la administración de drogas, por ejemplo derivados de setas amanita phalloides, y fármacos, así antihelmínticos así 1,4-fenilendiisotiacianato, a ratas Wistar gestantes que producen ictericia en las ratas recién nacidas (Ogawa y cols., 1983; Hosoda y cols., 1997). En estos modelos postnatales se consigue la producción de ictericia con inflamación de las vías biliares intrahepáticas aunque las alteraciones propias de la atresia biliar, como son la obstrucción biliar completa, tan solo se obtienen tras la administración a los animales gestantes de tóxicos o fármacos (Ogawa y cols., 1983; Hosoda y cols., 1997). Sin embargo, los animales y en particular los ratones, no cursan con fibrosis hepática ni con hipertensión portal, por lo que no es posible considerar a la atresia biliar en humanos. Se podría concluir que respecto de esta patología congénita, los modelos experimentales son apropiados para el estudio de las consecuencias hepáticas y extrahepáticas de la colestasis, aunque no para el estudio de los mecanismos productores de atresia biliar (Petersen 2012).

3. ALTERACIONES FISIOPATOLOGICAS EN LA COLESTASIS EXTRAHEPATICA EXPERIMENTAL.

La fisiopatología hepática en la colestasis extrahepática ha sido comparada a la que

protagoniza la curación de las heridas, ya que estaría constituida por la asociación de proliferación epitelial y fibrogénesis (Bissell 2004; Aller y cols., 2008a; Meran y Steadman 2011). Las alteraciones fisiopatológicas que se producen en la fibrosis hepática tienen por consecuencia el depósito excesivo de colágeno fibrilar y otras proteínas de la matriz extracelular que distorsionan la arquitectura hepática e inducen capilarización sinusoidal e hipertensión portal. En esencia, la fibrosis hepática es un proceso dinámico de reparación tisular aberrante en el que los fenómenos claves son la activación y transformación de las células estrelladas hepáticas quiescentes en células similares a miofibroblastos, por un proceso de transición epitelio-mesenquimal de tipo 2, con el subsiguiente incremento en la síntesis de proteínas, como actina de musculo liso- α , de colágeno, metaloproteasas de la matriz, inhibidores tisulares de metaloproteasas y proteoglicanos (Zitka y cols., 2010; Mormone y cols., 2011; Meran y Steadman 2011; Fragiadaki y Mason 2011).

En el periodo inmediato a la obstrucción completa de la vía biliar extrahepática en la rata se produce un intenso incremento de la presión biliar intraductal (Slott y cols., 1990; Woolf y cols., 1993; Azmaiparashvili y cols., 2009) seguida por alteraciones patológicas de la matriz extracelular (Desmouliere y cols., 1997). Por el contrario, la descompresión biliar, al suprimir el estrés mecánico, revierte las lesiones hepáticas inducidas por la ligadura del colédoco (Ramm y cols., 2000; Matsumoto y cols., 2002; Costa y cols., 2003; Kirkland y cols., 2010). Estos estudios demuestran la relevancia de la energía mecánica en la etiopatogenia de la patología hepática secundaria a la obstrucción de la vía biliar.

La respuesta del hígado de los roedores a la lesión obstructiva biliar implica su reprogramación transcripcional, favoreciendo la activación de genes reguladores del metabolismo, de la proliferación celular y de la remodelación de la matriz de forma secuencial y limitada en el tiempo (Campbell y cols., 2004; Wang y cols., 2008). Aunque se produce una activación predominante de genes metabólicos en todas las fases posteriores a la ligadura del colédoco, desde una fase inmediata (1 día) hasta una fase tardía (21 días), la afectación de vías metabólicas específicas es diferente dependiendo de la duración de la obstrucción (Campbell y cols., 2004). En tanto que algunos genes son activados en el periodo precoz de la colestasis, por ejemplo genes implicados en la disrupción del metabolismo lipídico y en la fibrosis, otros genes, como son los implicados en mecanismos de protección celular frente a la agresión por acumulación tóxica de ácidos biliares, son inhibidos (Kojima y cols., 2004).

Después de la ligadura del colédoco, el hígado de la rata sufre severas alteraciones hemodinámicas, portales y arteriales, que pueden comportar lesiones por isquemia-reperfusión y estrés oxidativo (Huang y cols., 2010; Yang y cols., 2011; Oguz y cols., 2012). El

aumento de la resistencia vascular en el sistema portal hepático secundario a colestasis extrahepática produce hipertensión portal (Ohara y cols., 1993; Li y Yang 2005; Van Steenkiste y cols., 2010) e isquemia hepática, asociadas a una síntesis deficitaria del enzima Óxido Nítrico Síntasa-inducible (iNOS) y de óxido nítrico (NO) (Barón y cols., 2000; Lee y Friedman 2011).

La vía biliar esta vascularizada por el plexo peribiliar (Gaudio y cols., 1996; Li y cols., 2007; Toki y cols., 2011), localizado alrededor de los conductos biliares de menor calibre, haciéndose así progresivamente más estrecho y más simple (Gaudio y cols., 1996). Estas características del plexo peribiliar, permiten asumir que el aumento de presión intraductal con dilatación de la vía biliar en la colestasis extrahepática, podría comprimir el plexo peribiliar con la consiguiente isquemia de la vía biliar. Sin embargo, se ha descrito que después de la disminución del flujo sanguíneo a través de la vena porta se produce un aumento del flujo arterial hepático o “hepatic arterial buffer response” (Lautt 1983). Además, dos semanas después de ligadura del colédoco en la rata se produce una proliferación significativa del plexo peribiliar, que drena por pequeñas vénulas en ramas de la vena porta y en los sinusoides hepáticos (Gaudio y cols., 2006). A su vez, la lesión por isquemia-reperfusión ha sido implicada en la patogénesis de la colestasis intrahepática (Tanaka y cols., 2006; Toki y cols., 2011). Las ratas con ligadura del colédoco sufren una excesiva acumulación de ácidos biliares hidrofóbicos que son considerados la causa principal de hepatotoxicidad (Gartung y cols., 1996; Poli 2000). Además, se produce un deterioro parcial de las funciones de la cadena transportadora de electrones mitocondriales y estrés oxidativo (Poli 2000; Huang y cols., 2003). La retención y el acúmulo de sales biliares hidrofóbicas (tauro- y glicoquenodesoxicolato) puede inhibir la actividad antioxidante hepática de catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reducido y superóxido dismutasa, así como inducir necrosis hepatocitaria al activar la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Orellana y cols., 1997; Mani y cols., 2002; Wang y cols., 2007; Portincasa y cols., 2007; Assimakopoulos y cols., 2007; Arduini y cols., 2011). Existe por tanto una estrecha relación entre la ictericia obstructiva experimental y el estrés oxidativo (Orellana y cols., 1997; Assimakopoulos y cols., 2004; Wang y cols., 2007). Así, se ha demostrado que el tratamiento con antioxidantes mejora el estado redox celular hepático (Assimakopoulos y cols., 2004; Soyly y cols., 2006), y las funciones hepáticas al inhibir la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Soyly y cols., 2006; Assimakopoulos y cols., 2007; Portincasa y cols., 2007; Tahan y cols., 2007).

Por consiguiente, en la fase precoz tras ligadura del colédoco en la rata el insuficiente aporte de oxígeno que sufre el hígado, como consecuencia de las alteraciones hemodinámicas, así como a la incorrecta utilización del oxígeno por la hepatotoxicidad de las

sales biliares, constituirían factores etiológicos esenciales de la inhibición del metabolismo energético hepático. Como consecuencia, el hígado reduce su capacidad funcional para poder satisfacer las necesidades metabólicas tisulares. La lesión oxidativa hepática podría disminuir el contenido intracelular de proteínas que participan en la síntesis energética y en las funciones de membrana, como son las proteínas reguladoras del transporte de H₂O e iones (Portincasa y cols., 2007), lo cual induciría edema intersticial y celular. Además, el aumento de peroxidación lipídica hepática, un marcador de estrés oxidativo (Portincasa y cols., 2007), puede relacionarse con el aumento de la permeabilidad de membrana, el aumento de la degradación de los componentes de la matriz extracelular y el edema (Kennett y Davies 2007).

La acumulación intersticial de fragmentos de Glicosaminoglicanos (GAGs) sería un importante mecanismo de la formación del edema debido a las propiedades hidrofílicas de GAGs, en particular de hialuronan (Day y de la Motte 2005; Cantor y Nadkarni 2006; Stern y cols., 2006; Kennett y Davies 2007; Yung y Chan 2007; Bartlett y cols., 2007; Jiang y cols., 2007). GAGs son largas cadenas de polisacáridos no ramificadas compuestas de unidades repetidas de disacáridos que tienden a adoptar conformaciones en espiral, muy extendidas y que ocupan un gran volumen en relación con su masa. Estos polisacáridos atraen y atrapan agua e iones, con lo cual forman geles hidratados, aunque permiten el flujo a su través de nutrientes para las células (Alberts y cols., 1983; Rhodes y Simons 2007; Jiang y cols., 2007). En situaciones de inflamación hialuronan es más polidisperso y tiende a formas de menor peso molecular, favoreciendo así la infiltración edematosa de los tejidos (Jiang y cols., 2007), el flujo del líquido intersticial y el gradiente de presión del sistema linfático (Chen y Fu 2005).

Además, la tensión mecánica producida por la ligadura del colédoco puede alterar por mecanotransducción la remodelación de los proteoglicanos y de GAGs en el intersticio (Evanko y cols., 2007). Virtualmente todos los órganos y tejidos están organizados en jerarquías estructurales y poseen una capacidad de respuesta mecánica inmediata aumentando su rigidez en proporción directa al estrés mecánico aplicado. La rigidez de la matriz extracelular y la tensión mecánica que resulta de la adhesión celular a sustratos rígidos, es fundamental para determinar el fenotipo expresado por muchas células en cultivo (Bischofs y Schwarz 2003).

En el modelo de fibrosis biliar por CCl₄ en la rata se ha descrito la inducción precoz de rigidez hepática. Este aumento de la consistencia y/o rigidez hepática parece ser el resultado del aumento de la cantidad de matriz neoformada, de la reticulación de la matriz y, posiblemente de otras variables desconocidas (Georges y cols., 2007). Asimismo, el aumento precoz en la rigidez hepática podría ser la causa de la diferenciación de los miofibroblastos

en las patologías hepáticas (Georges y cols., 2007; Muddu y cols., 2007). La expresión de la función miofibroblasto aporta a las células estrelladas hepáticas activadas la capacidad para comportarse como células musculares lisas y, por consiguiente, responden a las sustancias vasoactivas contrayéndose (Lee y Friedman 2011). Además, la contracción de las células estrelladas activadas regula el diámetro de la vascularización hepática y altera el flujo sanguíneo y la presión hepática (Winau y cols., 2008).

La adquisición posterior en la evolución del hígado colestásico de un fenotipo inmune afecta a las células parenquimatosas (hepatocitos y colangiocitos), a las no parenquimatosas (células endoteliales sinusoidales, células de Kupffer y miofibroblastos) y a las células sanguíneas que migran al intersticio hepático (Azouz y cols., 2004; Morwood y Nicholson 2006; Szabó y cols., 2007; Muddu y cols., 2007; Winau y cols., 2008). Sin embargo, el espacio intersticial parece ser el que modula la actividad inflamatoria de las células inmunes tras la ligadura del colédoco en la rata (Aller y cols., 2008a). En particular, los fragmentos de matriz extracelular y sus receptores ejercen importantes efectos sobre las células inflamatorias y, por ello, se considera que están claramente implicados en la evolución de la respuesta inmune intersticial (Morwood y Nicholson 2006; Adair-Kirk y Senior 2008; Yung y Chan 2007). Las Metaloproteasas de la matriz (MMPs) son una familia de enzimas que degradan componentes de la matriz extracelular que son expresadas en los tejidos inflamados (Cuenca y cols., 2006; Malemud 2006; Zitka y cols., 2010; Löffek y cols., 2011) y, en particular, en el hígado colestásico (Roeb y cols., 1997; Harty y cols., 2005; Bergheim y cols., 2006). La destrucción enzimática de la matriz extracelular cursa con la liberación inmediata de los mediadores secuestrados en dicha matriz (Stern y cols., 2006; Yung y Chan 2007).

Los fragmentos de la matriz extracelular están constituidos por moléculas con funciones proinflamatorias que pueden potenciar la respuesta inmune activando la respuesta inmune innata y la adquirida (Morwood y Nicholson 2006). Así, las proteínas de la matriz extracelular y el hialuronan ejercen una función proinflamatoria uniéndose a los receptores Toll-like (TLR)-4 y TLR-2 (Szabo y cols., 2007), con activación del complejo regulador transcripcional NF κ B/I κ B α y la producción de citoquinas proinflamatorias, como TNF- α e IL-1 β , y de quimioquinas que inducen la activación y el reclutamiento intersticial de leucocitos (Miyoshi y cols., 2001; Morwood y Nicholson 2006). Los linfocitos T, una vez activados, se polarizan hacia la producción de distintos perfiles de citoquinas (Zhu y cols., 2010; Yagi y cols., 2011). El tipo 1 (Th1) sintetiza Interferon γ (IFN- γ) e IL-2 y, los de tipo 2 (Th2) producen IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13. Las citoquinas Th2 están implicadas fundamentalmente en la mediación de la inflamación alérgica y los trastornos fibroproliferativos crónicos (Azouz y

cols., 2004).

Los macrófagos residentes en el hígado, o células de Kupffer, se localizan fundamentalmente en el área periportal del lobulillo y, debido a su localización, podrían desempeñar un papel fundamental en la lesión secundaria a isquemia-reperfusión (Kolios y cols., 2006; Abu-Amara y cols., 2010). Pero las células de Kupffer están también implicadas en la inflamación hepática que produce la colestasis mediante la liberación de sustancias biológicamente activas que inducen un proceso inmunopatogénico (Minter y cols., 2005; Abrahám y cols., 2008; Zandieh y cols., 2011; Cheng y cols., 2011).

Las células de Kupffer están claramente afectadas en la obstrucción biliar (Minter y cols., 2005; Abrahám y cols., 2008; Zandieh y cols., 2011; Cheng y cols., 2011) y muestran una activación de la fagocitosis y una marcada respuesta proinflamatoria frente a endotoxina y a la proteína de unión a lipopolisacárido (lypopolysaccharide-binding protein, LBP), ambas aumentadas en colestasis extrahepática (O'Neil y cols., 1997; Minter y cols., 2005; Kolios y cols., 2006; Isayama y cols., 2006; Minter y cols., 2009; Kassel y cols., 2012). La hipersensibilidad a endotoxina en colestasis es la causa de la síntesis aumentada de citoquinas proinflamatorias y del aumento de la peroxidación lipídica (Harry y cols., 1999; Isayama y cols., 2006; Abrahám y cols., 2008), con agravamiento de la apoptosis que, finalmente progresa a necrosis (Moazzam y cols., 2002). Sin embargo, la depleción de células de Kupffer agrava la inflamación y la necrosis hepatocelular en ratones con colestasis (Gehring y cols., 2006). La respuesta proinflamatoria inducida por LPS en ratas con ligadura de colédoco es inhibida por lipoproteínas de alta densidad (HDL), que, a su vez, inhibe las vías proinflamatorias hepáticas, restaura la actividad de eNOS y reduce la presión portal (Thabut y cols., 2007).

La inflamación se asocia siempre a la infiltración intersticial por leucocitos, un proceso que es regulado por quimioquinas (Aller y cols., 2006). En la colestasis extrahepática monocitos/macrófagos infiltran el hígado, que hiperexpresa a su vez proteína quimioattractora de monocitos (monocyte chemoattractant protein, MCP-1), una quimioquina CC y, como resultado éstos monocitos favorecen la respuesta inflamatoria (Imamura y cols., 2005; Sigal y cols., 2010). Además, la colestasis extrahepática estimula la síntesis de quimioquinas CXC que son, en parte, responsables de la infiltración de los tractos portales por neutrófilos (Saito y Maher 2000; Gujral y cols., 2003; Patsenker y cols., 2008; Aller y cols., 2010c; Mantovani y cols., 2011).

Los neutrófilos son componentes esenciales de la respuesta inflamatoria precoz a la agresión que sufre el hígado por colestasis (Shivakumar y cols., 2004; Laschke y cols., 2010).

En la colestasis extrahepática experimental la infiltración intersticial por neutrófilos ocurre ya a los tres días de la ligadura del colédoco (Levy y cols., 1993; Gujral y cols., 2003; Georgiev y cols., 2008). Las células del epitelio biliar contribuyen a la inflamación produciendo quimioattractantes de neutrófilos (Saito y Maher 2000; Dold y cols., 2010). Además, las células de Kupffer activadas por la endotoxemia portal secundaria a colestasis, estimulan la liberación de quimioquinas por los hepatocitos, lo cual implica a su vez la infiltración por neutrófilos (Wakabayashi y cols., 2008).

En esencia, la inflamación crónica hepática y la fibrogénesis constituyen un agregado dinámico de linfocitos, macrófagos y células del estroma relacionadas por interacciones autocrinas y paracrinas (Holt y cols., 2008). En ratas con ligadura de colédoco a largo plazo persiste una importante migración celular alrededor de la triada portal y de la vena central que se asocia con un aumento de citoquinas proinflamatorias en el hígado (Fernández-Martínez y cols., 2006). Sin embargo, las citoquinas proinflamatorias inducen una respuesta hepatocitaria heterogénea al estímulo colestásico con una inhibición selectiva de los hepatocitos de la zona periportal (Donner y cols., 2007).

Ambos tipos celulares presentes en el intersticio hepático, las células estrelladas y los miofibroblastos, tienen la capacidad de expresar un fenotipo inmune. En particular, las células estrelladas hepáticas sintetizan un amplio espectro de mediadores inflamatorios, como quimioquinas (MCP-1, RANTES), factor de activación plaquetario (platelet activation factor, PAF), IL-8 y moléculas de adhesión leucocitaria (ICAM-1, VCAM), que son necesarias para el reclutamiento y la activación de los leucocitos en el intersticio (Alberts y cols., 1983; Bataller y Brenner 2005; Rockey 2006; Iredale 2007; Gressner y cols., 2007; Friedman 2008; Kassel y cols., 2012). El alojamiento de leucocitos en el espacio intersticial hepático es favorecido por las células estrelladas hepáticas ya que éstas células expresan MMPs, lo cual aumenta la degradación de la matriz extracelular (Day y cols., 2005; Rockey 2006; Gressner y cols., 2007; Aller y cols., 2010a; Caughey 2011). Por lo tanto, las células estrelladas hepáticas cambian su fenotipo contráctil a un fenotipo inmune. Se considera que éstos dos fenotipos están íntimamente relacionados, e incluso son interdependientes (Cassiman y cols., 2002a; Rockey 2006; Aller y cols., 2010a.)

La infiltración del hígado colestásico por células inflamatorias (monocitos, neutrófilos) también sería secundaria a translocación bacteriana intestinal. Endotoxinas y bacterias de procedencia intestinal alcanzarían el hígado en elevadas concentraciones como consecuencia del aumento de la permeabilidad de la barrera mucosa intestinal (Balzan y cols., 2007). La translocación bacteriana intestinal es una complicación de la hipertensión portal y,

por consiguiente, se produce en ratas con ligadura de colédoco (Garcia-Tsao y Wiest 2004; Sztrymf y cols., 2005; Karatepe y cols., 2010; Huang y cols., 2012). Las bacterias que colonizan la luz intestinal constituyen un gran reservorio de productos microbianos, como LPS, endotoxinas y otros fragmentos de la pared bacteriana, que son capaces de inducir la síntesis de citoquinas proinflamatorias (Garcia-Tsao y Wiest 2004). Por lo tanto, la translocación bacteriana es un mecanismo etiopatogénico de infecciones bacterianas en la colestasis experimental (Sztrymf y cols., 2005; Abdeldayem y cols., 2007; Minter y cols., 2009). El aumento de la producción de TNF- α puede inducir translocación bacteriana en ratas con cirrosis y ascitis ya que el bloqueo de TNF- α es capaz de inhibirlo sin aumentar la incidencia de infecciones sistémicas (Sztrymf y cols., 2004; Francés y cols., 2007; Aller y cols., 2010b; Corradi y cols., 2012)

Las fases evolutivas tardías del modelo experimental de colestasis extrahepática se caracterizan por el desarrollo de angiogénesis, esto es, el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a expensas de vasos pre-existentes (Kurz y cols., 2003; Davis 2011; Geudens y Gerhardt 2011). Aunque el objetivo final de la proliferación endotelial es formar nuevos vasos sanguíneos para el transporte de oxígeno, sustratos y células sanguíneas (fase vascular), el endotelio posee otras funciones antes de que los nuevos vasos se desarrollen (fase prevascular) (Aller y cols., 2007a; Aller y cols., 2007b). Así, en las fases iniciales de la respuesta inflamatoria (fenotipos de isquemia-reperfusión y leucocitario), las nuevas células endoteliales podrían adoptar una función anti-inflamatoria. Dichas propiedades, anti-oxidantes y anti-inmunes, favorecerían la resolución, así como la progresión al fenotipo angiogénico vascular (Aller y cols., 2007b; Rhodes y Simons 2007). La angiogénesis requiere la migración de células endoteliales al espacio intersticial, con la consiguiente proliferación y diferenciación en capilares (Aller y cols., 2007b).

En ratas con ligadura de colédoco la proliferación de los conductillos biliares, como ocurre en la organogénesis hepática, precede a la proliferación de los microvasos que los vascularizan. Después de una semana de ligadura de colédoco, a pesar de la intensa proliferación biliar, el plexo arterial peribiliar mantiene su arquitectura normal. Por el contrario, después de 2 a 4 semanas de evolución se desarrolla una significativa proliferación de la microvascularización que se extiende desde el plexo peribiliar de los tractos biliares (Gaudio y cols., 1996; Glaser y cols., 2009; Glaser y cols., 2011).

El papel fundamental que ejercen los colangiocitos en la angiogénesis que ocurre después de la ligadura del colédoco en la rata ha sido corroborado al asociar la ligadura de la arteria hepática a la colestasis por ligadura del colédoco. En ésta situación, el hígado sufre un

aumento de la apoptosis de colangiocitos, se altera la proliferación de los colangiolos con disminución de la secreción de factor de crecimiento de endotelio vascular (vascular endothelial growth factor, VEGF) por los colangiolos y desaparece el plexo peribiliar. Curiosamente, las funciones de los colangiocitos y, por lo tanto, la integridad del plexo peribiliar son preservadas mediante el tratamiento con VEGF-A recombinante (Gaudio y cols., 2006). Igualmente, en el trasplante de hígado en el ser humano la regeneración biliar se produce a expensas de una proliferación inicial del compartimento epitelial, seguido del compartimento vascular que parece ser inducido por la expresión epitelial de VEGF-A (Van den Heuvel y cols., 2006).

Las células cebadas por su gran capacidad para sintetizar y almacenar mediadores inflamatorios pueden protagonizar la respuesta inflamatoria esplácnica que se produce en la ictericia obstructiva experimental (Aller y cols., 2010b). En la producción de la fibrosis biliar secundaria a colestasis extrahepática por ligadura y sección del colédoco han sido implicados mediadores de los sistemas nervioso: Norepinefrina; inmune: citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento, y endocrino: el sistema renina-angiotensina. A su vez, la fibrosis hepática que se produce en roedores tras la ligadura y sección del colédoco es la consecuencia de un proceso inflamatorio de origen biliar (Kershenovich y Weissbrod 2003; Li y Crawford 2004; Allen y cols., 2011) cursando, por lo tanto, con las alteraciones propias de la inflamación: estrés oxidativo y nitrosativo y deterioro de la actividad antioxidante, edema de los tractos portales, activación de los macrófagos hepáticos y reclutamiento de células inflamatorias, en particular infiltración neutrofílica de los espacios periductulares hepáticos y de células cebadas en los espacios porta y en los septos portales en la vecindad de los capilares del plexo arterial peribiliar (Rioux y Wallace 1996; Takechita y Shibayama 2005). En este sentido, la fibrosis biliar es similar al proceso de reparación tisular que ocurre en la curación de las heridas y que se caracteriza por acúmulo de proteínas de la matriz extracelular, en particular de colágeno (Ng y Swartz 2006; Aller y cols., 2008a).

Aunque todas las células hepáticas tienen un potencial fibrogénico, son las células estrelladas hepáticas las principales productoras de colágeno en el hígado. Sin embargo, en tanto que las células estrelladas hepáticas activadas son el principal tipo celular fibrogénico en las áreas pericentrales, los miofibroblastos portales pueden predominar cuando la lesión hepática tiene lugar alrededor de los tractos portales, como es el caso de la colestasis extrahepática, en la cual se produce una intensa respuesta fibrótica en los tractos portales (Lazaridis y cols., 2004; Mormone y cols., 2011; Lee y Friedman 2011). De hecho, se ha demostrado que los fibroblastos portales son capaces de transdiferenciarse en

miofibroblastos en modelos experimentales de fibrosis en roedores, tras ligadura del colédoco, y en la cirrosis biliar humana (Kinnman y Housset 2002; Kruglov y cols., 2006; Omenetti y cols., 2008a; Omenetti y cols., 2011a).

Las células cebadas o mastocitos están ampliamente distribuidas por prácticamente todos los tejidos vascularizados del organismo, donde se localizan en estrecha proximidad con los vasos sanguíneos y los nervios (Galli y cols., 2005a). Son especialmente abundantes en los lugares anatómicos que están directamente expuestos al medio ambiente, como son el tracto gastrointestinal, la piel y las vías aéreas (Galli y cols., 2005b; Metz y cols., 2007). Se ha demostrado que las células cebadas están presentes en el hígado, tanto en condiciones normales como patológicas en el ser humano y en la rata (Farrel y cols., 1995; Rioux y Wallace 1996). Múltiples estudios han comprobado que los mastocitos están implicados en diversas hepatopatías (Farrel y cols., 1995; Armbrust y cols., 1997; Yamashiro y cols., 1998; Matsunaga y Terada 2000), demostrándose así que éstas células inmunes tienen un papel más amplio de lo que se pensaba originalmente (Franceschini y cols., 2006).

Las células cebadas contienen histamina, heparina, serinproteasas, como quimasa y triptasa, y citoquinas multifuncionales (Theoharides y cols., 2012), que son importantes mediadoras de los procesos de cicatrización y curación de las heridas (Artuc y cols., 1999). Por lo tanto, las células cebadas desempeñan un papel clave en la remodelación tisular y la fibrosis. Diversos mediadores sintetizados por estas células, como triptasa, TGF- β y TNF- α , pueden inducir la proliferación de fibroblastos y de células estrelladas hepáticas y la síntesis de colágeno por distintos tipos celulares (Gordon y Galli 1994; Vliagoftis y Befus 2005). Las células cebadas producen además metaloproteasas de la matriz (MMP-1, MMP-2 y MMP-9), así como inhibidores tisulares de MMPs (TIMP-1), lo cual indica que están también implicadas en la degradación de la matriz extracelular, contribuyendo por tanto a un desequilibrio entre su síntesis y su degradación (Armbrust y cols., 1997).

Las células cebadas activadas producen gran cantidad de factores fibrogénicos y quimiotácticos que inducen la proliferación de los fibroblastos y la síntesis de colágeno (Welle 1997; Valent y cols., 1998). Las células cebadas, por tanto, contribuyen a la fibrosis, remodelación y reparación tisular y se acumulan en la enfermedad inflamatoria intestinal en el ser humano, incluyendo la colitis ulcerosa, el síndrome de intestino irritable y la enfermedad de Crohn (He 2004), así como en la enteropatía hipertensiva portal en la rata (Díez-Arias y cols., 2001; Prieto y cols., 2005). Además, las células cebadas están implicadas en el desarrollo de fibrosis en patologías del cartílago articular, la piel, el pulmón, el riñón y el hígado (Armbrust y cols., 1997; Kondo y cols., 2001; Valent 2013).

En el hígado se acumulan células cebadas en múltiples enfermedades (Fallerel y cols., 1995), como son la hepatopatía alcohólica, la cirrosis biliar primaria, la colangitis esclerosante primaria, la atresia biliar, la hepatolitiasis, el rechazo crónico del injerto hepático y en la colestasis biliar. Al igual que en otros órganos y tejidos, en el hígado las células cebadas deben estar implicadas en la respuesta inmune local y en el mantenimiento y la reparación del tejido conectivo.

En el hígado, las células cebadas secretan varios mediadores que promueven el crecimiento y la proliferación de los fibroblastos y que estimulan la producción de proteínas de la matriz extracelular por los fibroblastos y las células estrelladas (Valent y cols., 1998; Takeshita y Shibayama 2005). De hecho, existe una correlación positiva entre el grado de acumulación de células cebadas y la extensión del depósito de matriz en pacientes con hepatopatías crónicas (Fallerel y cols., 1995). Incluso en la actualidad se considera que la proliferación ductular biliar, unido a la fibrosis y a la infiltración hepática por células cebadas son los cambios característicos de la hepatopatía colestásica (Takeshita y Shibayama 2005).

Se ha comprobado que la degranulación de las células cebadas está implicada en la disrupción de los complejos motores celulares secundaria a la acción de la colecistoquinina, por lo tanto, las células cebadas están activamente implicadas en el control fisiológico y patológico de la motilidad intestinal (Saavedra y Vergara 2003), así como en la permeabilidad de la mucosa intestinal, en la adherencia bacteriana a la mucosa y en el inicio de la inflamación intestinal.

En el hígado colestásico se produce la infiltración por células inflamatorias (monocitos, neutrófilos, células cebadas), en parte como consecuencia de translocación bacteriana intestinal. Sin embargo, el origen de la respuesta inflamatoria podría estar localizada en los propios colangiocitos, que sufren tanto la hiperpresión biliar y el efecto tóxico de los ácidos biliares, como la posible isquemia secundaria a la compresión del plexo arterial peribiliar (Nakamura y cols., 1997; Gurish y Boyce 2006; Gaudio y cols., 2006; Allen y cols., 2011). En éste sentido, la respuesta inflamatoria inicial en los colangiocitos estimularía su proliferación, activaría las células hepáticas que poseen capacidad proinflamatoria (células de Kupffer y macrófagos), induciría la angiogénesis secundaria a la isquemia arterial, favorecería la infiltración portal por leucocitos y, finalmente promovería la fibrogénesis.

Las células cebadas participan en el desarrollo de fibrosis hepática, tanto en roedores como en el ser humano (Armbrust y cols., 1997; Matsunaga y cols., 1999). La ligadura del colédoco en la rata, un modelo de fibrosis hepática (Kountouras y cols., 1984), cursa con un aumento de las células cebadas en el hígado (Mori y Bartoloni 1966; Rioux y Wallace 1996;

Hallgreen y Gurish 2007). Sin embargo, todavía se desconoce el mecanismo por el cual las células cebadas participan en el desarrollo de fibrosis. Ya que la ligadura del colédoco en la rata produce una inflamación hepática (Ramadori y Saile 2004a) y muchos mediadores liberados por las células cebadas son pro-inflamatorios (Galli y cols., 2005a; Metz y cols., 2007a; Theoharides y cols., 2012), se podría especular que la activación de las células cebadas influiría en la fibrosis hepática en el contexto de una respuesta inflamatoria crónica. En este sentido, la fibrosis asociada a la remodelación tisular, ambas mediadas por los mastocitos, podrían ser una de las principales consecuencias de la inflamación hepática crónica (Bachelet y cols., 2006; Metz y cols., 2007a). Por ello, se ha sugerido que la fibrogénesis hepática se asemeja a un proceso de cicatrización (Ramadori y Saile 2004a; Ramadori y Saile 2004b; Aller y cols., 2008a)

Las interacciones entre las células cebadas y los fibroblastos son fundamentales en la génesis de la fibrosis (Gruber 2003; Albrecht y cols., 2005). Las células cebadas pueden comunicarse con los fibroblastos, lo cual induce su activación y la subsiguiente modulación de algunos aspectos de la fibrosis (Albrecht y cols., 2005; Au y cols., 2007). Sin embargo, los resultados de un estudio que utilizaba ratas *Ws/Ws*, deficientes en células cebadas, sugirió que un aumento de células cebadas en el hígado podría estar asociado con fibrosis, pero que no era la causa (Sugihara y cols., 1999). Además, las células cebadas deben participar en la fibrinólisis produciendo MMP-1 en los estadios tardíos, tanto de la fibrosis como de la cirrosis experimental (Jeong y cols., 2002). Ya que las terapias efectivas de la cirrosis hepática deben estar basadas en la comprensión de su patogenia (Friedman 2008), un mejor conocimiento de ésta acción dual, pro- y anti-fibrogénica de las células cebadas en la fibrosis biliar experimental sería de gran interés.

Las células cebadas en el hígado fibrotico pueden además estar implicadas en la arterialización hepática ya que la estructura de los sinusoides cambia y es similar a la de los capilares (Zimmermann y cols., 1999). Este cambio se denomina “capilarización sinusoidal” y las células cebadas pueden ser elementos clave en éste proceso de transformación de las células endoteliales sinusoidales en células endoteliales de tipo capilar (Zimmermann y cols., 1999; Franceschini y cols., 2006). La capilarización altera el intercambio fisiológico entre el plasma y los hepatocitos y es la causa principal del empeoramiento de la función hepática (Zimmermann y cols., 1999).

La hiperplasia de las células cebadas se asocia con la proliferación biliar durante la colestasis extrahepática (Takeshita y Shibayama 2005; Franceschini y cols., 2006). Este hallazgo sugiere que la acumulación de células cebadas en las tríadas portales puede estar

implicada en la proliferación biliar. La recanalización del colédoco previamente ligado comporta un incremento brusco y transitorio del número de células cebadas, que se asocia con un rápido aumento del número de células epiteliales biliares apoptóticas. Así, las células cebadas intersticiales hepáticas pueden estar implicadas en la remodelación hepática mediante la inducción de apoptosis (Takeshita y Shibayama 2005).

Por lo tanto, se podría especular que el papel de las células cebadas en la colestasis extrahepática experimental es doble, es decir, que cambia a lo largo de la evolución del hígado colestásico. En fases evolutivas precoces las células cebadas participarían en el proceso proinflamatorio que induce la proliferación biliar y la fibrogénesis (Rioux y Wallace 1996; Metz y cols., 2007b). Sin embargo, la colestasis prolongada al modificar el medio ambiente induciría un cambio en el fenotipo de los mastocitos, promoviendo la fibrolisis al inducir metaloproteasas y, subsiguientemente la degradación de la matriz (Jeong y cols., 2002). Este supuesto papel protector y antifibrótico de las células cebadas en la colestasis crónica explicaría el incremento persistente de su número durante la producción de fibrosis y/o cirrosis hepática, que se asocia con un marcado descenso de miofibroblastos y de macrófagos en las regiones periportales (Jeong y cols., 2002). Las células cebadas, debido a su localización periportal, inducirían la apoptosis del epitelio biliar reduciendo la apoptosis hepatocitaria y éste puede ser otro mecanismo por el cual las células cebadas inducen una actividad antifibrogénica, así como la preservación de los hepatocitos (Canbay y cols., 2004; Ghavami y cols., 2005).

Al corregir el desequilibrio epitelial producido por la colestasis entre los dos tipos de células epiteliales hepáticas, biliar (proliferación) y hepatocitario (apoptosis), los mastocitos intentarían limitar la fibrosis característica de la inflamación hepática crónica. Estas acciones protectoras pueden ser asumidas en algunas circunstancias por las células cebadas que protagonizarían entonces el control de la inflamación (Kinet 2007; Metz y Maurer 2007). La hiperexpresión de citoquinas proinflamatorias por los colangiocitos colestásicos también podría regular tanto las alteraciones en la secreción biliar (Geier y cols., 2003) como la supervivencia de los propios colangiocitos (Woolf y Vierling 1993).

La ligadura del colédoco en la rata causa la proliferación biliar con elongación del árbol biliar, así como su ramificación (Nakanuma y cols., 1997; Masyuk y cols., 2001). A su vez, la proliferación biliar induce la proliferación vascular o angiogénesis. La vía biliar se rodea de un plexo vascular arterial que procede de las ramas de la arteria hepática (Nakamura y cols., 1997). Durante el desarrollo embrionario las células epiteliales biliares migran a través del mesénquima y se transforman en túbulos durante el estadio de formación de la vía biliar

intrahepática (Roberts y cols., 1997). A su vez, el plexo vascular arterial peribiliar se desarrolla y madura en relación con el tracto biliar. Sin embargo, en tanto la vía biliar madura, el plexo vascular periarterial permanece inmaduro y continúa proliferando hasta que alcanza su madurez a lo largo de la vida postnatal (Nakamura y cols., 1997). En la colestasis extrahepática la proliferación biliar también parece preceder a la proliferación vascular (Gaudio y cols., 2006). Trás la ligadura del colédoco en la rata, la proliferación de colangiocitos es un proceso rápido que consigue ocupar el 30% del total de las células hepáticas, en tanto que en el hígado normal los colangiocitos representan el 2% de la masa celular hepática (Alvaro y cols., 2006). La proliferación de colangiocitos es modificada por neuropéptidos, factores de crecimiento y hormonas. En particular, el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) protagoniza la hiperplasia ductular. VEGF-A y VEGF-C aumentan en los conductos biliares de ratas con ligadura del colédoco ya que pueden ser secretados por los colangiocitos (Gaudio y cols., 2006). Puesto que VEGF también regula la angiogénesis, parece lógico suponer que los colangiocitos proliferantes controlan, mediante la liberación de VEGF, la formación de un plexo vascular que suministre sangre para cubrir las demandas funcionales del epitelio biliar intrahepático proliferante (Gaudio y cols., 2006)

La inflamación de origen biliar también puede inducir la apoptosis de los hepatocitos. La hiperproducción de citoquinas (TNF- α) se ha asociado a la apoptosis hepatocitaria (Ding y Yin 2004). En los síndromes colestásicos destaca la activación del factor de transcripción NF- κ B ya que las elevadas concentraciones de ácidos biliares en los hepatocitos activan NF- κ B (Miyoshi y cols., 2001; Zollner y cols., 2005). La activación de NF- κ B, a su vez, promueve la expresión de ligandos asociados a muerte celular por las células de Kupffer, como Fas y TNF, que son citotóxicos para el hígado (Nanji y cols., 1999; Ding y Yin 2004; Malhi y cols., 2006).

Las células progenitoras de células hepáticas ó células madre también podrían desempeñar un importante mecanismo en la proliferación biliar. En lesiones hepáticas por D-Galactosamina la regeneración del hígado ocurre a expensas de células epiteliales biliares, denominadas células ovas, que derivan probablemente de los canales de Hering. Ya que las células biliares que proliferan expresan α -1-fetoproteína, esta reactivación de genes fetales ha planteado la existencia de un proceso de retrodiferenciación en la colestasis (Kuhlmann y Peschke 2006).

En la colestasis extrahepática la alteración hepática predominante es la marcada proliferación ductular con una infiltración inflamatoria portal moderada y apoptosis hepatocitaria (Sánchez-Patán y cols., 2008a), constituyendo un modelo experimental de fibrosis biliar a largo plazo (Aube y cols., 2007; Sánchez-Patán y cols., 2008a).

La fibrosis hepática post-ligadura del colédoco en roedores es la consecuencia de un proceso inflamatorio de origen biliar (Kerhenobich y Weissbrod 2003; Li y Crawford 2004). La fibrosis hepática es la acumulación excesiva de proteínas de la matriz extracelular entre las que se incluye el colágeno (Bataller y Brenner 2005; Rockey 2006; Gressner y cols., 2007). Un concepto fundamental respecto de la etiopatogenia de la fibrosis hepática es que éste proceso representa una respuesta de cicatrización por parte del organismo frente a otra agresión que es similar a la respuesta de otros órganos a una agresión recurrente (Rockey 2006; Aller y cols., 2008b; Aller y cols., 2010c).

El estrés oxidativo y enzimático y la infiltración por células inflamatorias en la colestasis obstructiva experimental podrían estar implicados en la patogenia de la proliferación de células epiteliales biliares y en la reduplicación y ramificación de los conductos y conductillos biliares (Kilicoglu y cols., 2008). Así, se ha sugerido que el efecto hepatoprotector de la miel en ratas con ligadura del colédoco podría ser secundario a sus actividades antioxidante y anti-inflamatoria (Kilicoglu y cols., 2008).

Una intensa proliferación biliar en los espacios porta caracteriza a la colestasis extrahepática microquirúrgica a largo plazo en la rata. Los conductos biliares proliferantes invaden las zonas 1 y 2 del acino de Rapaport, pero no la zona 3 o pericentral (Aller y cols., 2004b) y ésta es la razón de que sea considerada una proliferación “atípica” (Alvaro y cols., 2007).

En esencia, la respuesta fisiopatológica del hígado cuando se alteran tanto el flujo biliar (colestasis extrahepática) como portal (capilarización sinusoidal e hipertensión portal) es la atrofia del área hepática afectada y la hipertrofia del área no afectada (Black y Behrns 2002). Histopatológicamente, el complejo atrofia-hipertrofia se caracteriza por fibrosis septal en el hígado atrófico con necrosis biliar en mosaico, apoptosis y proliferación ductular (Black y Behrns 2002; Kilicoglu y cols., 2008).

Los colangiocitos son un epitelio biológicamente importante por los múltiples procesos celulares en los que participan, incluyendo el transporte de agua, iones y solutos (Bogert y Larusso 2007). Estas células epiteliales biliares han sido propuestas como la “diana” principal de los ácidos biliares en el hígado. Los ácidos biliares alteran significativamente la secreción, la proliferación y la supervivencia de los colangiocitos (Xia y cols., 2006). Así, los ácidos biliares pueden antagonizar la pérdida de conductillos biliares inducida por la denervación colinérgica en la rata con ligadura de colédoco (Marzioni y cols., 2006). Sin embargo, durante su intensa proliferación en colestasis obstructiva, los colangiocitos adquieren un fenotipo neuroendocrino y secretan múltiples sustancias, entre las que se

incluyen neurotransmisores (serotonina) (Marzioni y cols., 2005), neuropéptidos (péptidos opioides, como met-enkefalina) (Moezi y cols., 2006; Mombeini y cols., 2006; Nelson y cols., 2006; Marzioni y cols., 2007), hormonas (prolactina) (Bogorad y cols., 2006) y sus receptores (estrógenos) (Alvaro y cols., 2007) y factores de crecimiento, como el Factor de crecimiento similar a Insulina (Insuline-like growth factor, IGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (platelet-derived growth factor; PDGF), el factor de crecimiento hepatocitario (hepatocyte growth factor, HGF), TGF- β y VEGF (Marzioni y cols., 2006; Alvaro y cols., 2007). La activación de células progenitoras hepáticas en el hígado colestásico es regulada por factores neuronales y neuroendocrinos que modulan la biología de los colangiocitos malignos y no-malignos (Marzioni y cols., 2006).

La activación de las células estrelladas hepáticas es un factor patogénico clave en la producción de fibrosis hepática ya que los miofibroblastos resultantes son principalmente responsables del ensamblaje del tejido conectivo (Rockey 2006; Gressner y cols., 2007; Proell y cols., 2007). Múltiples y variados estímulos contribuyen a la inducción y el mantenimiento de la activación de las células estrelladas hepáticas, como son el estrés oxidativo, los neurotransmisores (Norepinefrina), la cascada Renina-Angiotensina, citoquinas (IL-4, IL-13), quimioquinas y factores de crecimiento, p.ej. el factor de crecimiento transformador β 1 (transforming growth factor β 1; TGF β 1) y el factor de crecimiento de tejido conectivo (connective tissue growth factor; CTGF) (Sedlacek y cols., 2001; Rockey 2006; Muddu y cols., 2007; Gressner y cols., 2007; Proell y cols., 2007; Friedman 2008; Sánchez-Patán y cols., 2008a). En particular, los radicales libres de oxígeno son capaces de activar NF- κ B y así, la producción de citoquinas proinflamatorias (Aller y cols., 2004b). Se establecería por tanto una relación entre estrés oxidativo, inflamación y fibrogénesis (Ramadori y Saile 2004b). Además, las células epiteliales que proliferan también son una importante fuente de CTGF en la rata con fibrosis biliar (Sedlacek y cols., 2001; Kassel y cols., 2012).

En la colestasis los ácidos biliares inducen apoptosis de los hepatocitos y se ha propuesto que dicha apoptosis facilita a su vez la activación de las células estrelladas hepáticas (Canbay y cols., 2002). Por lo tanto, en la colestasis extrahepática los ácidos biliares están implicados tanto en la proliferación biliar como en la fibrogénesis (Isayama y cols., 2006). Además, la endotoxemia presente en colestasis (Ingoldby y cols., 1984) también podría exacerbar la fibrogénesis hepática. En ratones con colestasis extrahepática, la administración de LPS favorece la fibrogénesis hepática. Esta acción fibrogénica de LPS está mediada por CD14 y TLR-4 (Toll-like receptor-4) y es estimulada por la proteína de unión a lipopolisacárido (lipid binding protein; LBP) (Isayama y cols., 2006). Ratones con ligadura del colédoco y déficit

de CD4 no expresan TNF- α , IFN- γ , factor inductor de macrófagos (Macrophage induction factor, MIF), ni TGF β , una citoquina con potente acción fibrogénica (Yang y cols., 2003; Isayama y cols., 2006). Aunque la retención de ácidos biliares por sí sola es suficiente para producir lesión hepatocelular, proliferación biliar, respuesta inflamatoria moderada y discreta fibrosis, cuando se asocia a estímulo por LPS, mediado por el receptor CD14, se activan macrófagos y aumenta la síntesis de agentes oxidantes y de citoquinas y, en consecuencia, la fibrosis (Isayama y cols., 2006).

Las células estrelladas hepáticas, al ser estimuladas por PDGF, por factor de crecimiento epitelial (epithelial growth factor; EGF) y TGF β 1 expresan MMP-2, que induce su migración. La migración de las células estrelladas hepáticas es dependiente de Integrinas ya que la administración de anticuerpos anti-integrinas α 1 y α 2, inhiben dicha migración (Yang y cols., 2003). Otros mediadores que activan a las células estrelladas hepáticas son neurotransmisores, como noradrenalina, que aumentan la expresión hepática de TGF- β 1 (Oben y cols., 2004), leptina (Ikejima y cols., 2002) y angiotensina II, que no solo aumenta la fibrosis hepática, sino que promueve el estrés oxidativo, la inflamación y la trombogénesis (Bataller y Brenner 2005). Así, las células estrelladas hepáticas son posteriormente estimuladas de forma paracrina por trombocitos, leucocitos polimorfonucleares, células cebadas y linfocitos que infiltran el hígado, pero también por células de Kupffer, células endoteliales sinusoidales y hepatocitos para diferenciarse en miofibroblastos (Szabo y cols., 2007; Gressner y cols., 2007; Sánchez-Patán y cols., 2008a). Las células estrelladas hepáticas podrían también tener su origen en la médula ósea y adquirir el fenotipo miofibroblasto si está presente el medioambiente hepático estresor adecuado (Gressner y cols., 2007; Friedman 2008).

El miofibroblasto hepático es la principal célula responsable de la promoción del depósito de colágeno fibrilar en el hígado colestásico (Bataller y Brenner 2005; Gressner y cols., 2007). La gran plasticidad de los miofibroblastos hepáticos sugiere que incluso podrían coexistir diversos inmunofenotipos en la fibrosis biliar crónica, p.ej. portal, septal, intermedios o de transición y perisinusoidales (Cassiman y cols., 2002a). La coexistencia de transición epitelio-mesenquimal del epitelio biliar o de los hepatocitos ha sido también propuesta en ésta patología (Sicklick y cols., 2006; Henderson e Iredale 2007; Friedman 2008). La coexpresión de marcadores de células epiteliales y mesenquimales por algunas células del hígado adulto, sugiere que la existencia de transición epitelio-mesenquimal puede producirse también durante la vida post-natal. En los hígados fetales la transición epitelio-mesenquimal constituye un mecanismo implicado en el desarrollo hepático (Chagraoui y cols., 2003).

Asimismo, algunos hepatocitos adultos podrían ser capaces de sufrir una transición epitelio-mesenquimal ya que progenitores epiteliales hepáticos, esto es, las células ovales, expresan conjuntamente marcadores epiteliales y mesenquimales, en tanto que las células estrelladas hepáticas pueden ser inducidas para que expresen genes que las confieren un fenotipo epitelial (Sicklick y cols., 2006). Se explicaría así que conductillos biliares proliferantes en niños con atresia biliar expresen el marcador mesenquimal α -SMA. Por lo tanto, la transición desde el fenotipo epitelial al fenotipo mesenquimal en la colestasis extrahepática constituiría un nuevo mecanismo productor de fibrosis (Zavadil y Bottinger 2005; Sicklick y cols., 2006).

Dada la plasticidad de las células estrelladas hepáticas y de las células del parénquima hepático (eje hepatocito-colangiocito), puede hipotetizarse que durante la evolución del hígado colestásico éstas células pueden expresar los mismos fenotipos que se suceden en la respuesta inflamatoria post-traumática (Aller y cols., 2004b; Aller y cols., 2006): un fenotipo de isquemia-reperfusión (hipóxico), un fenotipo leucocitario (con respuesta pro y anti-inflamatoria) y, por último, un fenotipo angiogénico con proliferación biliar y fibrosis.

Durante estas fases evolutivas los colangiocitos podrían adoptar un comportamiento similar a las células tumorales con una complejidad metabólica progresiva (neuroendocrina), que se asocia a una complejidad estructural creciente. En éste supuesto, el tipo de tumor que se desarrolla sería benigno, a pesar de su importante capacidad para invadir el parénquima. Este tumor biliar “atípico”, parece capaz de inducir una respuesta inflamatoria en el hígado remanente o “hígado hepatocitario del huésped”. Además, es posible que éste hígado compuesto por hepatocitos del huésped pueda participar en el desarrollo del tumor biliar por un proceso denominado “desmoplasia”. Esto consiste en células fibroblásticas y matriz extracelular, elementos inflamatorios de respuesta inmune, representados por linfocitos, macrófagos y células dendríticas, con angiogénesis, evidenciada por los vasos sanguíneos neoformados (Mareel y Leroy 2003). En esencia, todos los elementos que constituyen la respuesta inflamatoria participan en ésta “reacción del hígado del huésped”, que puede tener un objetivo trófico para el desarrollo del tumor colestásico biliar. La persistencia de ésta respuesta inflamatoria durante una evolución más prolongada induciría un grado más intenso de dediferenciación tumoral (Arias y cols., 2005; Arias y cols., 2006; Arias y cols., 2007), produciendo una transformación celular maligna como ocurre en el ser humano cuando se produce un cáncer de la vía biliar o colangiocarcinoma (Marziani y cols., 2006; Yang y cols., 2011).

4. PATOLOGIA VASCULAR INTESTINAL LINFATICA EN LA INFLAMACION CRONICA

La alteración estructural básica encontrada en el tracto gastrointestinal en la hipertensión portal es vascular y consiste en el incremento del tamaño y número de los vasos sanguíneos (Misra y cols., 1997; Rondonotti y cols., 2006). En este sentido los estudios realizados sobre biopsias de 58 pacientes con hipertensión portal y de 38 pacientes sanos, demostraron la existencia de dilatación de los vasos de la mucosa con engrosamiento de la pared tanto en las muestras de biopsia duodenal y yeyunal de 39 (67%) y 41 (71%) pacientes respectivamente, en relación con los sujetos control, siendo estas diferencias estadísticamente significativas (Misra y cols., 1997). Otras características histológicas importantes en el grupo de pacientes con hipertensión portal incluye el edema de la lámina propia, la proliferación fibromuscular, la disminución de la relación vellosidad/cripta y el engrosamiento de la muscularis mucosae (Misra y cols., 1997; Rondonotti y cols., 2006). Por esta razón, se ha propuesto denominar a este tipo de enteropatía se llama Vasculopatía intestinal hipertensiva portal (Viggiano y Gostout 1992).

Además de la presión portal sostenida, las alteraciones incrementan el flujo linfático mesentérico y producen un deterioro del drenaje linfático, el cual es considerado un mecanismo etiopatogénico importante de la ascitis (Witte y cols., 1980; Chung y Iwakiri 2013). En los hígados fibroticos/cirróticos existe un incremento del flujo linfático. El fallo del sistema vascular linfático se manifiesta comúnmente en el desarrollo de ascitis. Un deterioro del drenaje linfático y un aumento de líquido intersticial son causas directas de formación de ascitis. Aunque la ascitis esta con frecuencia relacionada a descompensación de la enfermedad hepática crónica, también el flujo vascular linfático en el hígado puede estar incrementado en enfermedades extrahepáticas, como por ejemplo en la insuficiencia cardíaca crónica descompensada (Chung y Iwakiri 2013). A su vez, el fallo funcional crónico del sistema vascular linfático en la hipertensión portal produce una respuesta linfangiogénica compensatoria (Aller y cols., 2010d; Chung y Iwakiri 2013). El número de vasos linfáticos esta incrementado en los hígados fibróticos/cirróticos. Estudios de fibrosis experimental han demostrado que los niveles de los factores de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) aumentan su expresión en áreas de fibrosis hepática (Chung y Iwakiri 2013).

Se ha observado que en hígados cirróticos colestásicos, tanto el número como el área de los vasos linfáticos se incrementan alrededor de los tractos portales dependiendo de la gravedad de la fibrosis. De manera similar en ratas con cirrosis causada por la inhalación de tetracloruro de carbono (CCl₄), el incremento de los vasos linfáticos fue observado también en los tractos portales. En particular, se demostró que existe un incremento significativo de

la expresión de un factor inductor de la linfangiogénesis, como es el VEGF-D, en hígados con cirrosis (Chung y Iwakiri 2013).

En la actualidad, se admite que tanto la ascitis como el síndrome hepatorenal son algunas de las complicaciones más graves de la cirrosis así como de la hipertensión portal. Respecto del síndrome hepatorenal, que como se ha mencionado es una grave complicación de la insuficiencia hepática crónica en fase terminal, ocurre principalmente en pacientes no solo con cirrosis avanzada sino que además sufren disfunción circulatoria marcada con ascitis.

En la actualidad se desconocen las características de las alteraciones vasculares linfáticas intestinales propias de la hipertensión portal, máxima cuando se asocia con insuficiencia hepática crónica (Aller y cols., 2010d). Por esta razón uno de los objetivos del presente trabajo es el estudio de la distribución de la alteraciones linfáticas intestinales en un modelo experimental de hipertensión portal crónica secundaria a fibrosis biliar.

Ya que las alteraciones esplácnicas asociadas a la insuficiencia hepática crónica son consideradas de naturaleza inflamatoria (Aller y cols., 2007b; Cazzaniaga y cols., 2009; Mehta y cols., 2014; Sipeki y cols., 2014) se podría considerar que la linfangiopatía hipertensiva intestinal asociada a fibrosis biliar en la rata tendría similar etiopatogenia, en cuyo caso sería posible su reversibilidad mediante el tratamiento con células madre mesenquimales debido a su potencial antiinflamatorio, inmunosupresor y reparación tisular (Singer y Caplan 2011; Sutton y Bonfield 2014; Tsuji y cols., 2014). Aunque inicialmente las células madre mesenquimales se utilizaron principalmente para obtener la regeneración de tejidos, posteriormente demostraron su beneficio para la reparación tisular en patologías causadas por la respuesta inmunitaria como son el trasplante de órganos y las enfermedades autoinmunes tales como la enfermedad de injerto contra huésped, la enfermedad neurológica desmielinizante (esclerosis múltiple), lupus eritematoso sistémico y enfermedad de Crohn, entre otras (Singer y Caplan 2011).

II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPOTESIS

En el modelo experimental de Insuficiencia hepática crónica por colestasis microquirúrgica, se ha demostrado la existencia de una respuesta inflamatoria esplácnica.

Ya que en esta respuesta inflamatoria, uno de los factores patogénicos predominantes es la excesiva respuesta angiogénica intestinal, se considera que complementariamente existiría una respuesta patológica linfangiogénica asociada.

Por esta razón se ha considerado que el tratamiento de la insuficiencia hepática crónica con células madre mesenquimales prediferenciadas a hepatocitos, reduciría la inflamación crónica esplácnica y por lo tanto disminuiría la linfangiogénesis intestinal.

Para demostrar esta hipótesis se utilizó un modelo experimental microquirúrgico de colestasis extrahepática en la rata en el cual se ha estudiado principalmente las alteraciones linfáticas intestinales, así como su respuesta al tratamiento con xenotrasplante de células madre mesenquimales de origen adipocítico prediferenciadas a hepatocitos.

2. OBJETIVOS

1. Demostrar la existencia de patología linfática intestinal en el modelo de colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata.
2. Determinar la distribución de la patología microcirculatoria linfática intestinal en dicho modelo experimental.
3. En este modelo de colestasis obstructiva en la rata, el tratamiento mediante el xenotrasplante de células madre de origen adipocítico prediferenciadas a hepatocitos reduciría la patología linfática intestinal.

III. MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS

1. MATERIAL

1.A. ANIMALES

Se utilizaron 36 ratas macho de la cepa Wistar procedentes de las instalaciones homologadas para la cría de animales de experimentación de la Unidad de Cirugía Experimental del Hospital Universitario la Paz, en Madrid. Todos los ejemplares cumplían los requisitos de salud para animales de experimentación recomendados por la *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA). Los pesos corporales de los animales oscilaron entre 218.5 y 334 gramos ($276 \pm 57,8$ g).

1.B. INSTALACIONES

1.B.1. ANIMALARIO

La estabulación se efectuó en una sala acreditada para tal fin en el Animalario de la Unidad de Cirugía Experimental del Hospital Universitario de La Paz. Dicho Animalario es un Centro de Asistencia a la Investigación con registro nº 28079-15 ABC-M en la Dirección General de Agricultura y Alimentación de la Comunidad Autónoma de Madrid que cumple con los requerimientos legislativos relativos a la experimentación animal (R.D. 1201/2005). El Animalario cuenta con instalaciones óptimas homologadas para la cría, mantenimiento y cuarentena de animales de experimentación, así como también con instalaciones propias para la investigación, quirófanos y laboratorios anejos para la manipulación y toma de muestras y alojamiento de roedores durante el postoperatorio.

1.B.2. UNIDAD MICROQUIRURGICA

La técnica quirúrgica en la que se fundamenta el modelo experimental de la colestasis extrahepática microquirúrgica, fue realizada en la Unidad de Cirugía Experimental del Hospital Universitario La Paz, en una sala que dispone de:

- Refrigerador para conservación de los fármacos anestésicos.

- Mesa de trabajo de 80 x 100 cm.
- Sillas ergonómicas ajustables en altura.
- Microscopio operatorio Carl Zeiss OPMI 1-DFC nº serie 211069.
- Centrífuga refrigerada superspeed Du Pont Instrument (GIRALT Sorval® RC-5B).
- Balanza de precisión para pesado de los animales Jadever LPW- 1260 nº certificado PM-245/04 (Jadever Scale Co.LTD, Taiwan).
- Contenedor desechable de residuos biológicos cortantes y punzantes.
- Vaporizador de flujo continuo para la anestesia inhalatoria, tipo TEC 4 (Ohemeda)
- Fuente de O₂ (suministro centralizado). También disponible en bombona: 10.6 m³ de O₂ a 200 Kg/cm²
- Arcón congelador Koxka a -80 °C.

1.B.3. LABORATORIO DE INGENIERIA CELULAR

- Medio de expansión DMEM high glucose + 10% FBS, más 1% P/S, Na-piruvato, glutamina
- Medio de expansión: 60% DMEM-LowGlucose (Gibco); 40%MCDB-201 (Sigma); 1% ITS (Gibco); 10⁻⁹ M dexametasona (Sigma); 10⁻⁴ M ácido ascórbico 2 fosfato (Fluka); 10 ng/ml rhEGF (R&D); 5% FBS (Gibco); 1% Pen/Strep (Gibco); 0.6% Glutamina (Gibco)
- Medio de diferenciación celular: Igual que el de expansión pero sin FBS y con 10ng/ml de rhHGF (Gibco) + 10 ng/ml de rhOSM (Sigma)
- Suero bovino fetal (FBS)
- Solución salina Hanks balanced SALT solution, HBSS, (Invitrogen)

1.B.4. SALA DE EVOLUCION POSTOPERATORIA

La Unidad de Cirugía Experimental del Hospital Universitario de la Paz posee instalaciones propias acondicionadas para el mantenimiento y el control de la evolución postoperatoria de las ratas.

1.B.5. SALA DE SACRIFICIO Y PROCESADO DE MUESTRAS

Esta sala dispone de los siguientes elementos:

- Mesa de trabajo
- Sillas ergonómicas ajustables en altura.
- Lámpara halógena de brazo con bombilla de 60 W.
- Contenedor hermético con bolsa para residuos biológicos.
- Contenedores desechables de residuos biológicos punzantes.
- Centrífuga.
- Formaldehído al 2%
- Máquina de perfusión de formaldehído Dynamax – Rainin Model RP-1.
- Elementos de protección individual: guantes y gafas.

1.B.6. AREA DE CONSERVACION DE MUESTRAS

Se realizó en un espacio habilitado para ese fin en la Unidad de Cirugía Experimental del Hospital Universitario de la Paz. La misma dispone de un congelador SANYO MDF-U5186S nº de serie 50709226 (*SANYO Electric Biomedical Co., Ltd Japan*) que conserva las muestras a -80°C .

1.B.7. ELIMINACION DE RESIDUOS BIOLOGICOS

Los residuos biológicos se almacenaron en espera de su eliminación en un área especial que dispone de un congelador tipo arcón modelo ZCF320L/2 Zanussi (*Electrolux Home Products España, S.A. Madrid*).

1.C. FÁRMACOS

1.C.1. ANESTESICOS

- Isoflurano: concentración de inducción al 3-5%, y de mantenimiento al 2%.

1.C.2. OTROS FARMACOS

- Ceftriaxona sódica (D.C.I), 500 mg. (Ceftriaxona Normon 500 mg FG Lab. Normon S.A. Madrid).
- Fitomenadiona, vit. K₁ ampollas 1ml con 10 mg. (Konakion® Roche Farma S.A. Madrid).
- Buprenorfina (Buprex®).

- Tramadol 100 mg (Adolonta® GRÜNENTHAL PHARMA S.A.)
- Prograf (Tacrolimus) concentrado de solución para perfusión 5mg/ml: 0.10 mg/kg/día.
- Fibrinogeno humano + Trombina humana (Tachosil®), esponja 5.5 mg/2 UI (Lab. NYCOMED PHARMA)

1.D. MATERIAL

1.D.1. INSTRUMENTAL QUIRURGICO

Caja con instrumental de microcirugía, que incluye:

1.D.1.a. PINZAS

- Clamp de paños BACKHAUS de 13.3 cm (2)
- Disección con dientes de 13cm (1)
- Disección de Adson con dientes de 12cm (1)
- HALSTED Mosquito curva sin dientes de 12.7 cm (2)
- HALSTED Mosquito recta sin dientes de 12.7 cm (2)
- Pinza de Heiss recta (1)
- Pinza de Heiss curva (1)
- Pinza de microcirugía recta de 10.5 cm (1)
- Pinza de microcirugía curva de 10.5 cm (1)
- Porta-agujas Mayo-Hegar de 12.7 cm. (1)

1.D.1.b. TIJERAS

- De Metzembaum curva de 14 cm (1)
- De Mayo recta de 14 cm (1)
- Tijera de microcirugía recta de 15 cm (1)

1.D.2. MATERIAL DE SUTURA Y LIGADURA

- Seda trenzada ligadura 3/0 Silkam®. (B. Braun España)
- Seda negra trenzada ligadura 6/0 Silkam®. (B. Braun España)
- Sutura de VICRYL® (poliglactina 910) aguja curva 3/0. (Ethicon Inc.)
- Sutura de seda negra trenzada aguja curva de 3/0 Silkam®. (B. Braun España)

1.D.3. MATERIAL QUIRURGICO COMPLEMENTARIO

- Paños quirúrgicos.
- Guantes de exploración de látex natural sin polvo. Talla 7 ½ (King TM Amebil S.A. Vizcaya. España)
- Guantes quirúrgicos de látex natural con polvo (estériles). Talla 7 ½ (Medi-Grip® Plus. Ansell Ltd. UK)
- Gasas de 10 × 10cm (Envase de 10 unidades Texpol® Manresa. España)
- Torundas de algodón pequeñas montadas (Algodones del Bages, S.A. Barcelona. España)

1.D.4. OTROS MATERIALES PARA EL PROCEDIMIENTO OPERATORIO Y LA EXTRACCION DE MUESTRAS

- Guantes de protección frente a mordedura de animales
- Bloque de plastilina de 10 × 2 × 3 cm
- Jeringas de 10, 5 y 2 ml BD Discardit TM II (Becton Dickinson S.A. Fraga. Huesca. España)
- Aguja de tipo Luer 20G 0.91×25.4 mm (monoject magellan Safety Needle. Tyco Healthcare Group LP.USA)
- Aguja de tipo Luer 21G 0.82×38.1 mm (monoject magellan Safety Needle. Tyco Healthcare Group LP. USA)
- Aguja de tipo Luer 25G 0.51×15.8 mm (monoject magellan Safety Needle. Tyco Healthcare Group LP. USA)
- Hoja de bisturí de acero estériles del nº 11 (Albion Surgical Limited. Sheffield. England)
- Solución Salina isotónica: ClNa, 0.9 g/100ml. Envase 10 ml B.Braun
- Contenedor cilíndrico de polietileno para residuos biológicos marca Consenur de 30 litros fabricado según norma DIN-30739.
- Contenedor de polipropileno para residuos biológicos punzantes y cortantes marca Biocompact 1.8 litros (Sanipick Plastic SA. Madrid)
- Bolsas de plástico de 15 litros para residuos biológicos
- Recipiente de acero inoxidable para transporte de nitrógeno líquido Airliquide GT 2 (Airliquide España)
- Guantes de protección frente frío Midera 10

1.E. LABORATORIO DE HISTOLOGIA

El procesado de las muestras histológicas y su posterior estudio microscópico se efectuó en el Laboratorio del Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

1.F. ANESTESIA

Se utilizó anestesia inhalatoria con Isoflurano 3 – 4 % para la inducción anestésica, y continuamos con Isoflurano 2% para el mantenimiento.

1.G. REACTIVO

Anticuerpo Policlonal contra el LYVE-1, dilución 1:500, Abcam® - Reino Unido.

2. METODOS**2.A. CONDICIONES DE ESTABULACIÓN Y UTILIZACIÓN DE LOS ANIMALES**

La estabulación se realizó de acuerdo con la legislación vigente en nuestro país durante el tiempo en el que se ha realizado la parte experimental del presente trabajo sobre el cuidado y la utilización de animales de laboratorio, por la cual España adopta la normativa de la Unión Europea de 1996 sobre el uso de animales con fines científicos. Se incorporó a nuestro ordenamiento legal con fecha de 4 de Agosto de 1986 en el Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. (BOE 252; 21-10-2005). (Aller y cols., 2009a).

Los animales se mantuvieron a una temperatura de 20 ± 2 °C, y con una humedad relativa del 65 ± 10 %. Las condiciones de luz / oscuridad fueron cíclicas estableciéndose períodos alternos de 12 horas (8:00 – 20:00 / 20:00 – 8:00). Los animales se mantuvieron en estanterías, y en grupos de 2 en cajas homologadas para tal fin: Plexiglas de 42x65x15 cm (Letica, España) móviles con lecho de viruta (Panlab S.L. Barcelona). Dichas cajas fueron etiquetadas, y consignándose en éstas últimas los datos de identificación de los animales allí alojados. Todos los animales fueron alimentados con una dieta estándar para roedores de laboratorio (rata /ratón dieta de mantenimiento A04. Panlab: España) y agua ad libitum. (Aller y cols., 2009a).

2.B. DISEÑO EXPERIMENTAL

Las ratas fueron agrupadas aleatoriamente para su estudio en los siguientes grupos (Figuras 1)

- **Grupo I:** animales pseudo-operados (PSO).
- **Grupo II:** animales sometidos a colestasis microquirúrgica (CM).
- **Grupo III:** animales sometidos a colestasis microquirúrgica que recibieron xenotrasplante hepático de células madre mesenquimales de origen adipocítico (CMX).

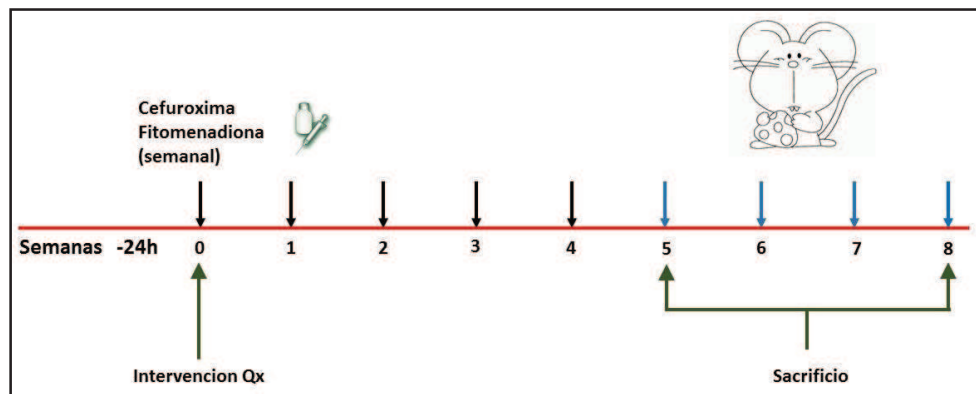


Figura 1. Esquema cronológico de los pasos a los que se somete a las ratas *Pseudo-operadas* (PSO), *Colestasis microquirúrgica* (CM) y con *Colestasis microquirúrgica* que recibieron un xenotrasplante hepático de células madre mesenquimales de origen adipocítico (CMX) a lo largo de la evolución del modelo experimental.

2.C. TÉCNICA ANESTÉSICA

El principal objetivo de la anestesia cuando se utilizan animales de laboratorio es de carácter ético y consiste en evitarles el dolor y el sufrimiento innecesarios. Independientemente del método anestésico elegido por cada grupo de Investigación, éste debe conseguir suficiente relajación muscular para que la cirugía pueda ser realizada fácilmente, debe bloquear la actividad refleja para impedir la activación del Sistema Nervioso Autónomo y, por lo tanto alteraciones de la frecuencia y del ritmo cardíaco y, lo más importante, la técnica anestésica debe procurar un grado suficiente de pérdida de conciencia por hipnosis que, unido a la analgesia, impida que el animal sufra dolor. En definitiva, el objetivo fundamental de la anestesia es causar a los animales de experimentación el mínimo distrés físico y psicológico asociado a la cirugía experimental (Aller y Nava 2009).

Entre los múltiples métodos de anestesia descritos en la rata los fundamentales son los que utilizan la vía inhalatoria o la parenteral. En este estudio, la anestesia se administró por vía inhalatoria utilizando Isoflurano, con una concentración de inducción al 3-4%, y de mantenimiento al 2%, administrada a través de un vaporizador de flujo continuo para la anestesia inhalatoria, tipo TEC 4 (Ohemeda), conectada a una fuente de O₂. Esta pauta proporciona un plano anestésico quirúrgico y adecuada relajación muscular durante el tiempo que dura la intervención. Una vez finalizado el tiempo quirúrgico la recuperación espontánea de la consciencia se produce habitualmente entre los 5 y 10 minutos. Por la sensibilidad de los pequeños roedores a la hipotermia (Rodríguez 1989), durante el postoperatorio inmediato se colocó a las ratas en un ambiente cálido suministrado por una manta eléctrica (Aller y Nava 2009).

2.D. TÉCNICAS QUIRÚRGICAS

2.D.1 PSEUDO-OPERACIÓN

Con la rata en decúbito supino, y tras colocar un bloque de plastilina en la zona dorsolumbar, se realiza una laparotomía media xifopubiana, las asas intestinales se cubren con una gasa humedecida en suero salino isotónico (0.9%) a temperatura corporal, y son desplazadas hacia el lado izquierdo. A continuación, se secciona el ligamento falciforme situado entre los Lóbulos hepáticos lateral izquierdo y caudado, y posteriormente los ligamentos triangulares izquierdo y derecho (Figura 2).

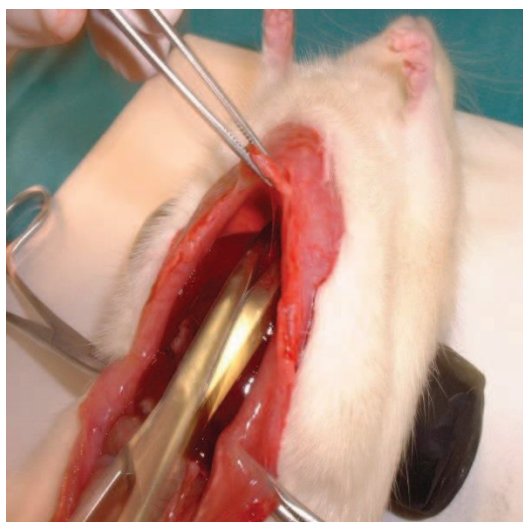


Figura 2. Laparotomía media y sección del ligamento falciforme en la rata.

Las maniobras anteriores permiten una exposición adecuada del hilio hepático y la tracción ligera del duodeno hacia el lado izquierdo permite visualizar la vía biliar, que es la estructura hiliar más superficial en la rata (Lorente y cols., 2009) (Figura 3). Tras disecar el colédoco, se introduce el intestino en la cavidad peritoneal, y la pared abdominal se cierra en dos planos: peritoneo, músculo y aponeurosis mediante sutura continua reabsorbible Vycril® (polyglactin 910) de 4/0, y piel con sutura continua de seda de 4/0. (Lorente y cols., 2009).

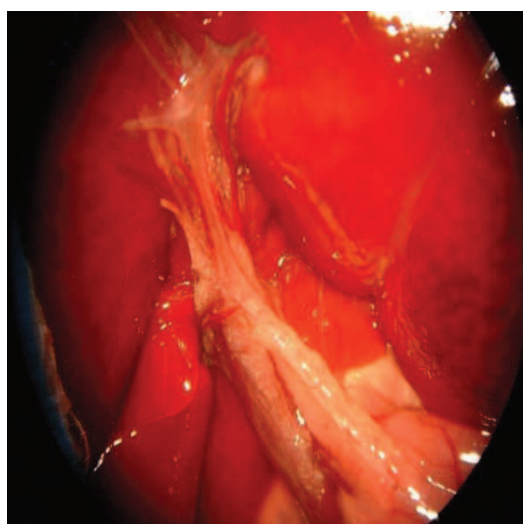


Figura 3. La vía biliar extrahepática en la rata es anterior respecto de las ramas de la arteria hepática y éstas a su vez son anteriores respecto de las ramas portales.

2.D.2 COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA MICROQUIRURGICA

El parénquima hepático de la rata se compone de cuatro lóbulos: lóbulo lateral derecho (LLD), lóbulo medio (LM), lóbulo lateral izquierdo (LLI) y lóbulo caudado (LC), que a su vez poseen una vascularización porto-arterial y un drenaje biliar individualizado (Lorente y cols., 1995) (Figura 4). Esta característica anatómica permite la resección de los conductos biliares que drenan los cuatro lóbulos hepáticos en continuidad con el colédoco hasta el inicio de su porción intrapancreática utilizando una técnica microquirúrgica (Aller y cols., 1993).

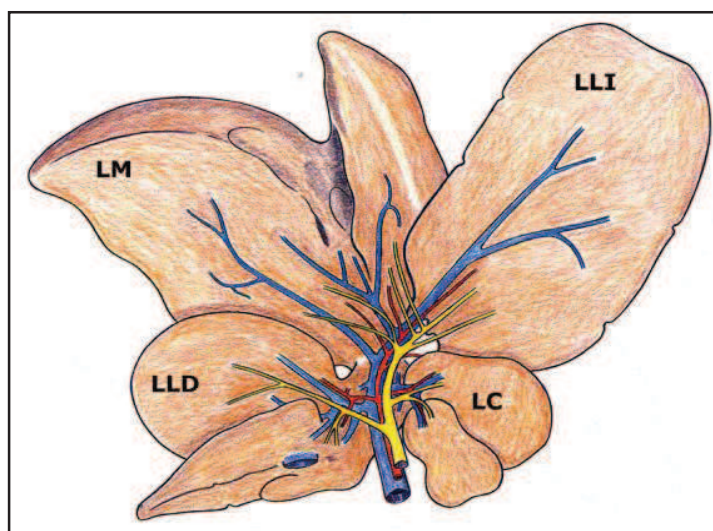


Figura 4. Representación del hígado de la rata dividido en cuatro lóbulos: medio (LM), lateral izquierdo (LLI), lateral derecho (LLD) y caudado (LC). En el hilio se puede apreciar la relación entre las ramas portales, arteriales y biliares, así como la ausencia de vesícula biliar. VBP: vía biliar principal, AH: arteria hepática, VP: vena porta.

Con la rata en decúbito supino, y tras colocar un bloque de plastilina en la zona dorsolumbar, se realiza una laparotomía media xifopubiana, seccionando posteriormente de forma consecutiva el ligamento falciforme, el ligamento situado entre el LLI y el LC, y los ligamentos triangulares izquierdo y derecho.

Para las siguientes fases de la intervención es necesario utilizar un microscopio operatorio binocular como medio de magnificación (Carl Zeiss, OPM 110). La tracción del duodeno hacia la izquierda permite visualizar el colédoco, que se liga y se secciona proximalmente al inicio de su porción intrapancreática (Figura 5).

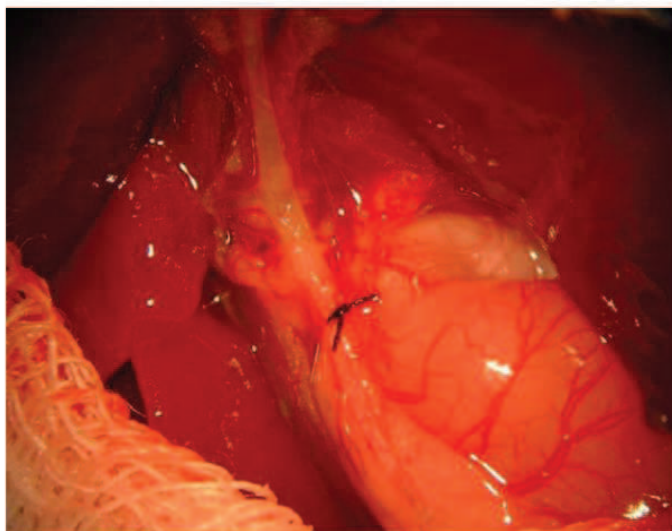


Figura 5. *Ligadura del colédoco al inicio de su porción intrapancreática.*

Esta maniobra, al producir una dilatación de la vía biliar extrahepática, facilita la disección posterior del colédoco y de los conductos biliares procedentes de los cuatro lóbulos hepáticos que constituyen el hígado de la rata. El colédoco, una vez seccionado, se desplaza proximalmente y se diseca hasta el origen de los conductos biliares propios del LLD y del LC. Después de disecar el conducto biliar del LC y de identificar la rama de la arteria hepática de este lóbulo, se liga y se secciona el conducto biliar lo más próximo posible de su salida del parénquima hepático (Figura 6 y 7).

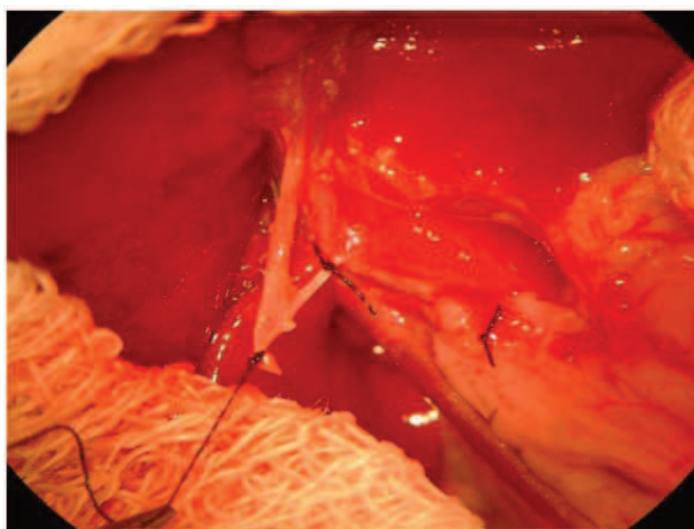


Figura 6. *Tracción del colédoco y ligadura de los conductos biliares procedentes del lóbulo caudado (LC).*

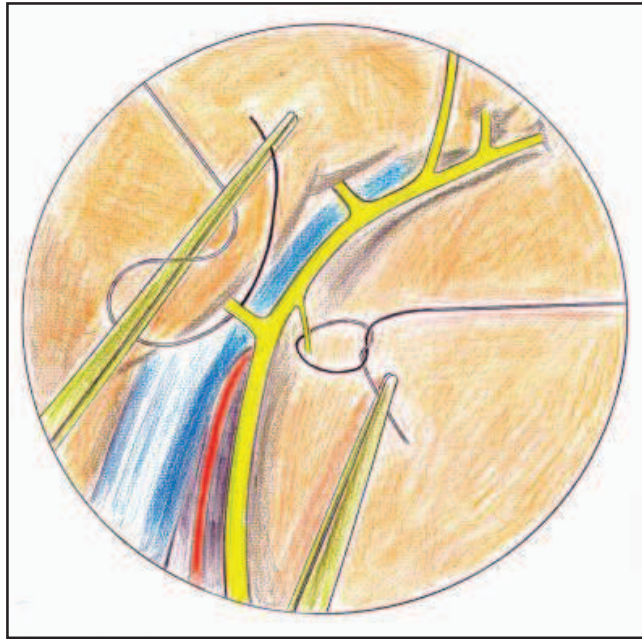


Figura 7. Disección y ligadura de los conductos biliares del lóbulo caudado y el lóbulo lateral derecho en el hígado de la rata

La disección, ligadura y sección del conducto biliar del LLD se realiza de igual forma.

Se continúa la disección proximal del colédoco, liberándolo del tejido graso y de las adherencias peritoneales, y se disecan proximalmente la arteria hepática y la vena porta hasta los conductos biliares procedentes del LM, que suelen ser 2 o 3 y que se disecan y se ligan independientemente después de identificar las ramas arteriales del LM. Por último, se diseca, se liga y se secciona el conducto biliar del LLI (Figura 8).

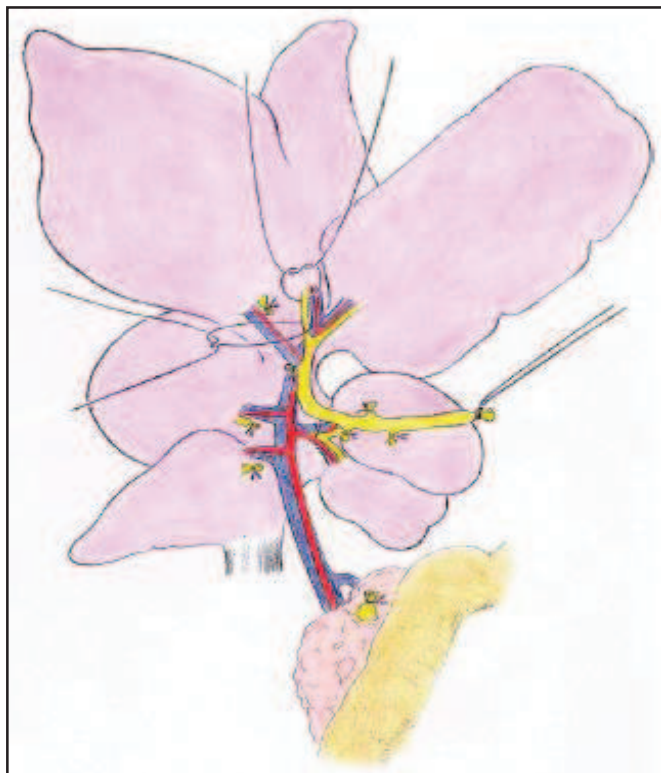


Figura 8. Disección y ligadura de los conductos que drenan el lóbulo medio (LM).

La disección y sección de los conductos biliares de los cuatro lóbulos hepáticos debe ser realizada sin lesionar la vascularización portal o arterial de estos lóbulos, cuya identificación es posible gracias a la utilización del microscopio operatorio. Es un requisito imprescindible cuando se realiza ésta técnica microquirúrgica no lesionar las ramas lobulares de la arteria hepática yá que la vascularización de la vía biliar, tanto intra como extrahepática, depende exclusivamente de la arteria hepática (Figura 9). Su lesión inadvertida al disecar y extirpar la vía biliar ocasionaría isquemia, necrosis y colangitis.

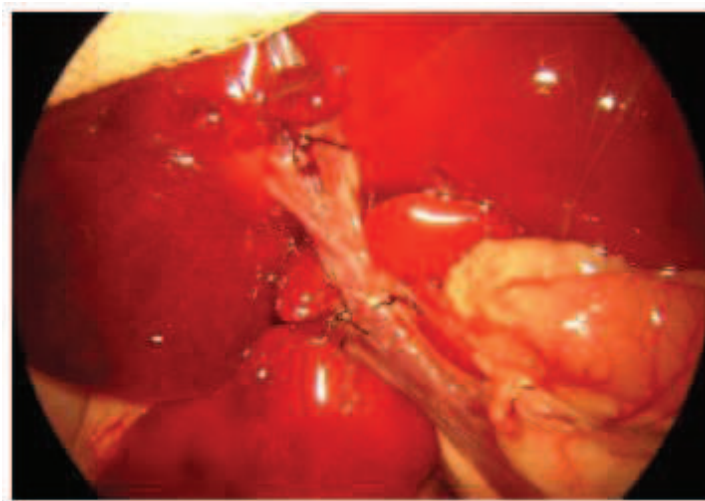


Figura 9. Vía biliar extrahepática completamente resecada

Seguidamente se reintegran las asas intestinales al interior de la cavidad abdominal y se procede al cierre del plano peritoneo-aponeurótico con Vicryl® (3/0) y de la piel con Seda (4/0).

Como profilaxis antibiótica se administra Ceftriaxona por vía intramuscular profunda (50 mg/kg) antes de la recuperación anestésica total de las ratas y Buprenorfina por vía s.c. cada 8 horas durante las primeras 24 horas de evolución.

2.E. OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE DE LIPOASPIRADO HUMANO

Se han utilizado las células madre mesenquimales obtenidas durante un Proyecto anterior financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias, extraídas de tejido adiposo obtenido de liposucciones estéticas electivas. El tejido obtenido de los pacientes donantes que así lo consintieron, siguiendo las directivas del BOE 2006/17/CE del 8 de febrero del 2006, fue procesado como más adelante se detalla. La fracción vasculo estromal (SVF) fue aislada del tejido adiposo utilizando un procedimiento basado en el descrito por Zuk y cols. en 2001 (Zuk y cols., 2001):

1. La muestra de tejido adiposo se digiere con un volumen de 1:1 de solución de colagenasa tipo I en PBS (ambos de Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) al 0,075% a 37° con agitación suave durante 30 minutos. Posteriormente, la actividad enzimática se neutraliza con un volumen 1:1 de DMEM + 10% suero bovino fetal (FBS) al 10% + 1% de solución antibiótica de penicilina y estreptomicina (Medio de cultivo, todos ellos de Gibco-BRL). Tras la incubación, el tejido se centrifuga a 300 x g durante 10 minutos, y el sobrenadante, consistente en gotas lipídicas,

adipocitos maduros, y la solución de colagenasa y medio se retira, dejando un pellet con la SVF.

2. Los eritrocitos contaminantes de esta fracción se lisan con un buffer de NH_4Cl 160 mM, 10 mM de KHCO_3 y 1 mM de EDTA e incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos. Dicho buffer se inhibe con PBS 5:1.
3. El SVF libre de eritrocitos contaminantes se aísla por centrifugación en las mismas condiciones anteriores, re-suspendida en medio de cultivo y sembrada a una densidad aproximada de 30.000 células por cm^2 y cultivada toda la noche a 37°C y 5% de CO_2 en medio de cultivo (DMEM con 10% FBS).
4. Posteriormente se lava con PBS con el fin de eliminar las células no adheridas y la población celular adherida, denominada lipoaspirado procesado (LPA) se cultiva en las mismas condiciones hasta su confluencia, cambiando el medio tres veces por semana.
5. Para su almacenamiento hasta su uso, se levantan con tripsina-EDTA al 0,05% en HBSS (Sigma) y se procede a su congelación en rampa (0,5°C/min) en medio de criopreservación (medio de cultivo con 10% DMSO, Sigma, San Louis, MS, USA) hasta los -80°C, para luego sumergirlas en N_2 líquido.

2.E.1. CARACTERIZACIÓN CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Las células mesenquimales de estirpe adipocítica, una vez descongeladas, son examinadas para determinar la expresión de moléculas de superficie típicas de células madre utilizando citometría de flujo. En concreto, se separan las células en función de si expresan marcadores de células madre mesenquimales utilizando anticuerpos primarios marcadores de células mesenquimales o estromales acompañantes CD31, CD34, CD45, CD105 y Stro-1 (Sigma) y anticuerpos marcadores de mesodermo (Vimentina; Sigma). En todos los casos se han utilizado anticuerpos secundarios anti-CD34 conjugado con ficoeritrina (Becton Dickinson) y/o anti-CD105 conjugado con fluoresceína (Chemicon). (Zuk y cols., 2001; Zuk y cols., 2002). Han sido establecidos un mínimo de 3 criterios como necesarios para considerar una población celular como células madre de origen mesenquimal (Dominici y cols., 2006). Primero, las células madre de origen mesenquimal deben poseer una plasticidad adherente cuando son mantenidas en condiciones estándar de cultivo. Segundo, las células madre de origen mesenquimal

deben expresar los marcadores CD105, CD73 y CD90, y carecer de la expresión de CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 α o CD19 y de moléculas de superficie HLA-DR. Tercero, las células madre de origen mesenquimal deben tener la capacidad de diferenciarse en los linajes mesodérmicos adipogénicos, condrogénicos y osteogénicos. Más del 90% de las células adherentes cultivada en SVF adquieren el marcador CD105 (Yoshimura y cols., 2006; Varma y cols., 2007). Consecuentemente, los cultivos de SVF han sido utilizados con objetivos terapéuticos en la mayoría de los estudios publicados.

2.E.2. CARACTERIZACIÓN CELULAR FUNCIONAL MEDIANTE DIFERENCIACIÓN

Se realiza una caracterización funcional de las células madre mesenquimales mediante inducción de la diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica:

1. Inducción osteogénica: (Guilak y cols., 2006): El medio de inducción osteogénica contiene DMEM (alta concentración de glucosa), con 10% de suero bovino fetal (FBS), 10 mM de glicerofosfato, 0.15 mM de ácido ascórbico-2-fosfato, 10 nM de 1,25- (OH) vitamina D₃, y 10 nM de dexametasona, además de solución antibiótica estándar (P/S). Las células se mantienen en cultivo 28 días, refrescando el medio 3 veces por semana, y el último día se medirá la actividad fosfatasa alcalina en células control y células inducidas para comprobar si se ha producido la diferenciación dirigida hacia osteocitos in vitro.
2. Inducción condrogénica: (Barry y cols., 2001): El medio de inducción condrogénica contiene DMEM-LG (baja concentración de glucosa), con 110 mg/L de piruvato sódico, 0.15 mM de ácido ascórbico-2-fosfato, 100 nM de dexametasona, 1% ITS y 10 ng/ml de TGF-1 y 1% de solución antibiótica. Las células se mantienen en cultivo durante 4 semanas para después comprobar la presencia de proteoglicanos sulfatados mediante tinción con azul Alcian.
3. Inducción adipogénica (Lin y cols., 2006): El medio de diferenciación adipogénica está constituido por: DMEM (Gibco) suplementado con 10% FBS (Gibco), 500 μ M IBMX (Sigma), 1 μ M dexametasona (Sigma), 1 μ M

Indometacina (Sigma). A las 72 horas se refresca el medio añadiendo 10 μ M insulina (Actrapid, Novonordisk) para a las 24 horas retirar el medio y cambiarlo por medio de diferenciación adipogénica sin insulina. El medio con insulina se añade, de esta manera, cada 72 horas, lavándolo a las 24 horas con medio sin insulina y se mantiene este protocolo durante 2 semanas, tras las cuales se revela la presencia de vacuolas lipídicas intracelulares mediante tinción Red Oil-O

2.E.3. DIFERENCIACIÓN IN VITRO DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE ADIPOCITOS EN CELULAS PROGENITORAS HEPATOCITARIAS

Las células aisladas del tejido adiposo humano se someten a condiciones de inducción hepatogénicas siguiendo el protocolo ya establecido por Seo y cols. en 2005 con pequeñas modificaciones: (Seo y cols., 2005): Las células se cultivan durante 7 días sobre un delgado sustrato de colágeno (0,1% en PBS; Sigma) en medio de inducción hepatogénica (60% DMEM-LG; 40% MCDB-201 (Sigma); 1% ITS (Gibco); 10⁻⁹ M dexametasona (Sigma); 10⁻⁴ M ácido ascórbico 2 fosfato (Sigma); 10 ng/ml rh EGF (R&D Systems); 10 ng/ml rh OSM, 10ng/ml rh HGF (todos de R&D Systems); 1% P/S (Gibco); 0.6% Glutamax (Gibco), que se refresca cada 2 días. Después del tiempo necesario (entre 2 y 4 semanas), se confirma la diferenciación dirigida hacia hepatocitos verificándose la expresión por las células madre de albúmina mediante inmunocitoquímica frente a albúmina (anticuerpo de Dako).

Previamente a su trasplante, las células mesenquimales prediferenciadas hacia el linaje hepatocitario se marcan con BromodeoxiUridina (1:1000) y fluorocromo CMDil (Molecular Probes, 1:200) con el objeto de identificarlas posteriormente en el parénquima hepático de la rata.

2.E.4. ADMINISTRACIÓN INTRAHEPÁTICA DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE ORIGEN ADIPOCÍTICO

La técnica utilizada para la administración de células madre ha sido mediante infiltración lobular hepática. Esta técnica consiste en la obtención de una suspensión de células madre (número de células madre: 4 x 10E6 células/rata en 1 cc de solución salina, Hanks balanced SALT solution, HBSS,

Invitrogen) e inyección mediante aguja de calibre 18G en los lóbulos hepáticos medio, lateral izquierdo y lateral derecho de 0.33 ml/lóbulo. Una vez inoculadas las células madre de origen adipocítico o la solución salina isotónica, se aplica un material hemostático (Tachosil®) sobre el sitio de punción hepática (Figura 10).

Los animales han sido tratados las 24 horas previas y tras la infiltración hepática de solución salina isotónica (1ml) o de células madre de origen adipocítico con inmunosupresión (Tacrolimus, 0.05 mg/Kg, 2 días a la semana) como profilaxis de rechazo, ya que son células de procedencia humana, y por lo tanto se trata de un xenotrasplante.



Figura 10. Inoculación de las células madre mesenquimales de origen adipocítico o la solución salina isotónica en el parénquima hepático. Inmediatamente después, se aplica un material hemostático (Tachosil®) sobre el sitio de punción hepática.

2.F. MANTENIMIENTO Y TRATAMIENTO POSTOPERATORIO

Una vez finalizada la intervención las ratas se colocaron en su caja de polycarbonato (42 x 65 x 15 cm, Letica. España) sobre un lecho de viruta especial para roedores de laboratorio (Panlab) que permite su estabulación en un medio limpio y seco, con luz poco intensa y en un ambiente tranquilo hasta que se recuperan de la anestesia. Debido a la especial sensibilidad de los pequeños roedores a la hipotermia (Rodríguez 1989; Aller y Nava 2009), la prevención de la hipotermia postoperatoria es de fundamental importancia. Por ello, inmediatamente después de la intervención

el animal se colocó cerca de una fuente de calor (una lámpara) sobre una manta eléctrica para mantener la temperatura corporal en el rango aconsejado para las ratas adultas (25-30°C) (Waynforth y Flecknell 2004).

Además en los roedores, es importante controlar la respiración durante el postoperatorio inmediato ya que es común la depresión respiratoria durante este periodo. Esta complicación es especialmente peligrosa ya que suele pasar inadvertida hasta que los animales sufren hipoxia e hipercapnia.

Durante una intervención quirúrgica, en particular si como en éste modelo experimental se realiza una laparotomía, se pierden abundantes fluidos por evaporación, lo cual se agrava ya que las ratas generalmente son incapaces de ingerir líquidos durante las primeras 12-24 horas del p.o. Por tanto, se deben aportar aproximadamente 40-80ml/kg/24h preferiblemente por vía oral si el animal ha recuperado la conciencia. En caso de que no se hayan recuperado del íleo paralítico se administra una solución salina-dextrosa (4% dextrosa, 0.18% salino) o salina (0.9%) por vía intraperitoneal o subcutánea (Aller y Nava 2009).

La realización de una laparotomía con manipulación de las asas intestinales y resección de la vía biliar en la rata cursa con un importante dolor p.o. En particular, las ratas Wistar tras sufrir una laparotomía adoptan posturas sugerentes de dolor abdominal arqueando la espalda, aumentan su frecuencia respiratoria y reducen la ingesta de líquidos y sólidos. Por éste motivo, como terapia analgésica se administró el opioide Buprenorfina (0.05mg/kg/12h) por vía subcutánea durante las primeras 24 horas de p.o. (Aller y Nava 2009). Buprenorfina ha sido muy utilizado en medicina veterinaria durante las últimas tres décadas porque proporciona un nivel de analgesia excelente y produce una mínima depresión cardíaca y/o respiratoria.

Los animales fueron sacrificados, dependiendo del grupo de estudio, a las 5 y a las 8 semanas del período p.o., durante el cual se les administró por vía i.m. profunda un antibiótico de amplio espectro (Ceftazidima; 50 mg/kg; dos veces a la semana) y Vitamina K1 (Fitomenadiona; 8mg/kg; una vez a la semana) como profilaxis anti-infecciosa y anti-hemorrágica, respectivamente (Aller y cols., 2009b). Además, con el objetivo de evitar el posible rechazo del xenotrasplante, se les administró Tacrolimus, (0.05 mg/Kg IM, 2 veces a la semana) desde las 24 horas previas a la inyección de células madre o suero (dependiendo de si trataba del grupo de estudio o grupo control) hasta el momento del sacrificio.

2.G. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES

Los animales supervivientes en cada serie fueron sacrificados por exanguinación entre las 5 y las 8 semanas del post-operatorio (Figura 11), en función del grupo al que pertenecieran. Antes de proceder a la anestesia y sacrificio de los animales se determinó su peso corporal (PC). La anestesia se realizó de nuevo por vía inhalatoria, a las concentraciones descritas con anterioridad. Tras colocar a la rata en decúbito supino se realizó una laparotomía xifopubiana y se realizó un estudio macroscópico de la cavidad abdominal, en el que se valoraba la presencia de líquido ascítico, el aspecto macroscópico de hígado y bazo, así como la presencia de circulación colateral portosistémica y de vasculopatía venosa mesentérica. De esta manera, durante el sacrificio, y de forma seriada, se valoraban los siguientes aspectos:

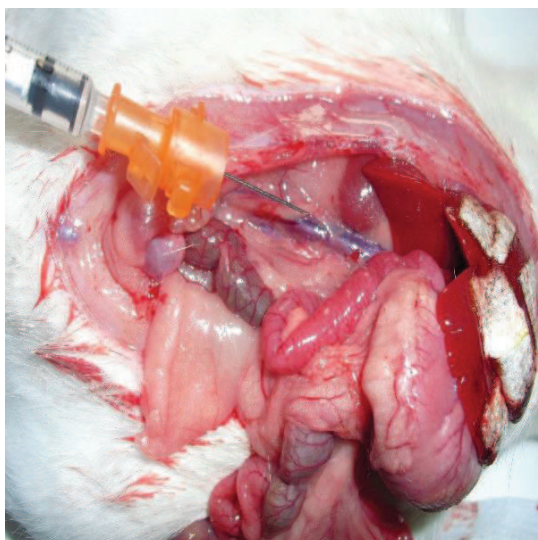


Figura 11. Extracción sanguínea de la vena cava inferior infrahepática.

2.G.1. CUANTIFICACION DEL LIQUIDO ASCITICO

Tras realizar la laparotomía, se valora si había líquido ascítico, y en el caso en el que este estuviera presente, se procedía a su cuantificación mediante aspirado con una jeringa de 10 cc.

2.G.2. CIRCULACION COLATERAL PORTOSISTEMICA

A continuación, se valoró la presencia de venas colaterales en aquellas áreas donde se desarrolla habitualmente circulación colateral venosa porto-sistémica, es decir, en las áreas esplenorrenal (ER) (Figura 12), gastroesofágica (colaterales paraesofágicas) (PE), y pararrectal (PR).

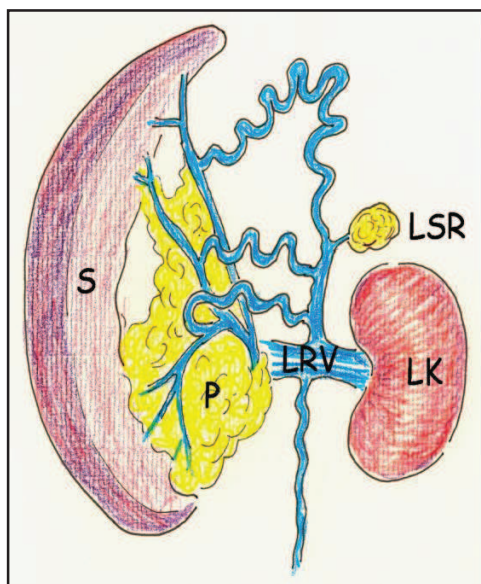


Figura 12. Clases de circulación colateral esplenorrenal en la colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata. S: bazo. P: páncreas. LRV: vena renal izquierda. LK: riñón izquierdo. LSR: glándula suprarrenal izquierda.

2.G.3. VASCULOPATÍA VENOSA MESENTÉRICA

Se denomina vasculopatía venosa mesentérica a la dilatación y tortuosidad de las ramas de la vena mesentérica superior. Se consideran tres grados de vasculopatía venosa mesentérica (Aller y cols., 2001) (Figuras 13 y 14):

- **Grado 0:** aspecto macroscópico normal de las ramas de la vena mesentérica superior.
- **Grado I:** dilatación y tortuosidad de las ramas mesentéricas, secundarias al clampaje de la vena mesentérica superior.
- **Grado II:** dilatación y tortuosidad espontáneas de las ramas de la vena mesentérica superior.

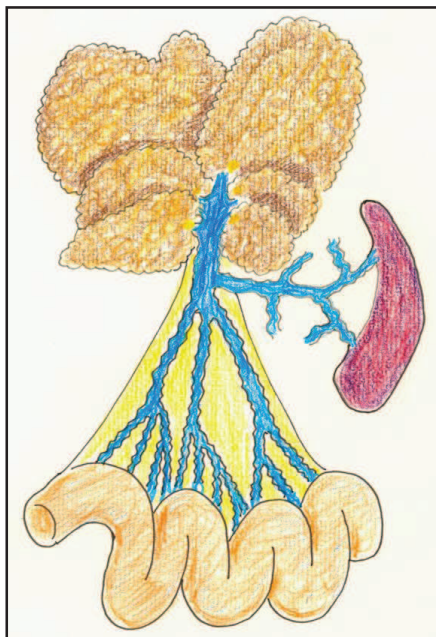


Figura 13. Representación esquemática de la vasculopatía venosa mesentérica de grado II de una rata con colestasis microquirúrgica a las ocho semanas de la intervención.

Para su estudio, se extrajeron parcialmente las asas intestinales, situando el árbol mesentérico por su región ileocecal, donde se visualizaron con facilidad las ramas de la vena mesentérica superior (Figura 14). Esto es, las ramas de primer y segundo orden o proximales, por su vecindad con la vena mesentérica superior, y las de tercer y cuarto orden o distales, por su vecindad con el intestino (íleon y ciego) (Castañeda y cols., 2000).

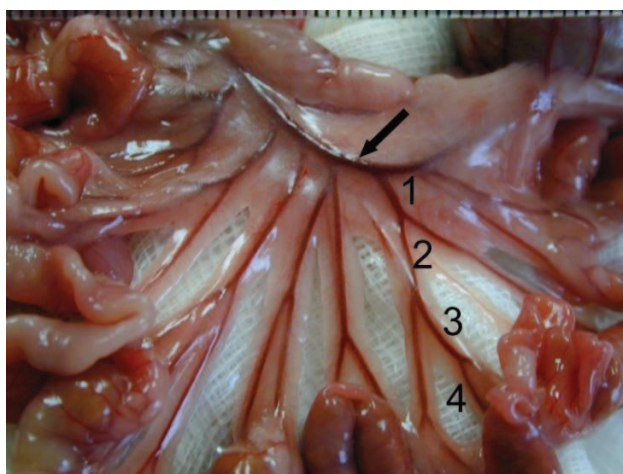


Figura 14. Vascularización venosa mesentérica en la que se observa la vena mesentérica superior (flecha) y sus ramas venosas de primer (1), segundo (2), tercer (3) y cuarto (4) orden.

2.H. ELIMINACION DE RESTOS BIOLOGICOS

Una vez tomadas las muestras los restos de los animales y los tejidos desechados de las vísceras fueron depositados en bolsas plásticas e introducidas en contenedores especiales. La gestión de los restos biológicos (recogida, transporte y tratamiento de los mismos) se realizó a través de la empresa CONSENUR, S. A. C/Rio Ebro, s/n. Polígono Industrial Finanzauto. Arganda del Rey (Madrid) que cumple con la normativa vigente: Decreto 83/1999, de 3 junio, por el que se regulan las actividades de producción y gestión de los residuos biosanitarios y citotóxicos en la Comunidad de Madrid.

2.I. ESTUDIO MICROSCOPICO E HISTOPATOLÓGICO

Para el estudio histopatológico se procesaron las muestras mediante técnicas para microscopía óptica.

2.I.1. FIJACIÓN Y TALLADO DE LAS PIEZAS

La fijación de los tejidos es indispensable para evitar los procesos autolíticos o post-mortem de las células de forma inmediata, y para que las estructuras tisulares se conserven e inmovilicen. Por esto los tejidos se introdujeron inmediatamente después de su extracción en formol tamponado al 10%, que tiene una penetración relativamente rápida en los mismos. Las muestras se mantuvieron en formol tamponado al 10% hasta el momento de su procesamiento.

Para asegurar la orientación isotrópica de las secciones de intestino, indispensable para la estimación no sesgada de la densidad de longitud de los vasos linfáticos, el tallado de las muestras de intestino se efectuó obteniendo secciones orientadas isotrópicamente al azar (secciones IUR, isotropic uniform random) (Baddeley y cols., 2006).

2.I.2. INCLUSIÓN

Tras el tallado macroscópico de los órganos, las piezas seleccionadas se incluyeron en parafina mediante un sistema automático, con temperatura y vacío controlado por ordenador (Histomatic 166 MP, Fisher).

2.1.3. PROCESADO DE LOS CORTES

Tras la inclusión, se procedió a realizar el corte de las piezas con un microtomo de parafina tipo Minot (Microm), obteniéndose secciones de 4 a 7 μm de grosor. A continuación, las secciones identificadas se pegaron en portaobjetos y se sometieron a Inmunotinción mediante la Técnica de Avidina-Biotina-Peroxidasa. Para visualizar los microvasos linfáticos, se ha empleado un anticuerpo policlonal contra LYVE-1, antígeno que se expresa en el endotelio de los vasos linfáticos de la rata (REF) (Abcam, UK) a una dilución de 1/100.

2.1.3.a INMUNOHISTOQUIMICA

Los métodos inmunohistoquímicos sirven para detectar antígenos celulares o tisulares y se basan en la reacción inmunológica de antígeno-anticuerpo. Para visualizar el lugar donde ocurre la reacción antígeno-anticuerpo es preciso emplear un marcador o trazador con el fin de conseguir la inmunolocalización. En este trabajo el marcaje se ha realizado con la enzima peroxidasa. El lugar de la reacción antígeno-anticuerpo se visualiza añadiendo al final de la reacción el sustrato de la enzima más un cromógeno (diaminobencidina en nuestro caso).

El producto originado al actuar la enzima sobre el sustrato interacciona a su vez sobre el cromógeno y da lugar a un precipitado insoluble y coloreado.

El método de la bencidina consiste en la aparición de un precipitado de color azul-verdoso debido a la formación de benzopurpurina tras la descomposición de la bencidina en presencia de peróxido de hidrógeno y por acción de la enzima peroxidasa. El inconveniente que tiene esta reacción deriva de la inestabilidad de la benzopurpurina. Para solventarlo, se sustituye la bencidina por un derivado; la 3,3'-diaminobencidina la cual proporciona pigmentos polimerizados de color pardo de mayor estabilidad. Se recomienda extremar precauciones en su manejo por su posible potencial carcinógeno.

El esquema de la reacción se presenta a continuación (Figura

15).

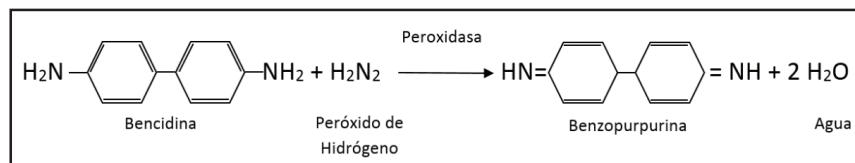


Figura 15. Representación esquemática de la reacción bioquímica del método inmunohistoquímico indirecto.

El método inmunohistoquímico utilizado en este trabajo es un método indirecto. Mediante este procedimiento, el anticuerpo primario sin conjugar se une con el antígeno presente en la sección de tejido. En una segunda fase se añade un anticuerpo secundario que en una tercera se conjugará con el marcador enzimático. Se ha utilizado el anticuerpo secundario biotinilado. La razón estriba en que las moléculas de biotina tienen gran afinidad por las moléculas de avidina de forma que general fuertes enlaces no inmunes entre sí. A su vez a molécula de avidina está formada por cuatro subunidades que configuran una estructura terciaria con cuatro regiones hidrofóbicas de unión a la biotina.

Por otro lado, la biotina a su vez se conjuga fácilmente de forma covalente con anticuerpos y marcadores. Se considera que pueden unirse hasta 150 moléculas de biotina en una sola molécula de anticuerpo. Aunque la avidina también tiene una gran capacidad de combinarse con anticuerpos, es la biotina la que normalmente se conjuga a su pequeño tamaño.

En este trabajo se ha aplicado un complejo de avidina y marcador enzimático biotinilado que contiene lugares de unión libres de avidina para que se produzca la fijación sobre el anticuerpo secundario biotinilado (método del complejo avidina-biotina-peroxidasa).

A continuación se muestra un esquema detallado del método inmunohistoquímico detallado (Figura 16).

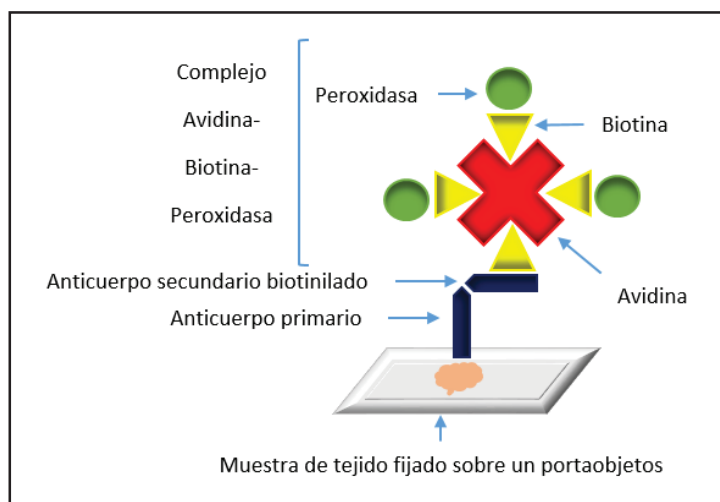


Figura 16. Representación esquemática del método Inmunohistoquímico indirecto.

2.1.4. METODOS CUANTITATIVOS

2.1.4.a. BREVES CONSIDERACIONES TEORICAS ACERCA DE LA CUANTIFICACION ESTEREOLOGICA

Para conocer la longitud de los vasos, el volumen vascular y la densidad vascular media, las hemos de cuantificar empleando técnicas estereológicas (Howard y Reed 1998; Howard y Reed 2005).

La estereología es la ciencia que permite cuantificar en tres dimensiones a partir de mediciones efectuadas en muestras de dos dimensiones (cortes histológicos).

El disector óptico es un paralelepípedo de dimensiones conocidas situado entre dos planos paralelos llamados plano de referencia y plano de observación, que están separados por una distancia prefijada. El disector óptico es una sonda de medida virtual que se introduce en el interior del tejido en estudio, en el que queremos contar un tipo de partículas de unas determinadas características.

El disector óptico permite registrar como una sola unidad partículas que por su forma o tamaño corten el plano de observación por múltiples lugares, como neuronas o vasos sanguíneos.

El disector es pues una sonda de medida que tiene unas dimensiones conocidas, tanto en lo referente a los planos de sección como a la profundidad. Esta sonda estudia una muestra del tejido en

cuestión y se puede introducir en el tejido cuantas veces se quiera. Como es fácilmente comprensible no se puede estudiar la totalidad de un tejido, además de que resulta innecesario. Lo más útil es seleccionar una muestra y estudiarla. Pero para que la muestra estudiada sea representativa de la población original se debe seleccionar al azar. Todas las partes del tejido a estudiar deben tener las mismas probabilidades de ser muestreadas por la sonda de medida.

Cada disector engloba un número determinado de partículas de las características que se están estudiando. Teniendo en cuenta los criterios de inclusión y exclusión de las partículas, no se deben incluir en el conteo las que aparecen a la vez en el plano de referencia y en el de observación (Gundersen 1986; Jensen y Sundberg 1986; Cruz-Orive 1987).

En el presente estudio, se han estimado fracciones de volumen de estructuras vasculares en los distintos compartimentos histológicos del intestino y en todos los grupos de animales.

Definamos primero lo que se entiende por fracción de volumen (densidad de volumen): dado un volumen de referencia (p. ej., la mucosa intestinal), la fracción de volumen (V_v) ocupada por los vasos es igual a la razón entre el volumen vascular y el volumen de toda la mucosa:

$$V_v \text{ vasc} = V \text{ vas} / V \text{ muc}$$

Este parámetro estereológico es útil para estimar el tamaño de un compartimento en relación al tamaño total del órgano y se puede expresar en porcentaje del espacio de referencia.

Para estimar las áreas se emplearon retículos de puntos; sobre un corte de tejido muestreado al azar, el retículo evalúa el número de puntos que caen sobre todo el corte (área de referencia) y sobre el compartimento a estudiar (por ejemplo, las estructuras linfáticas). Según el principio de Delesse (REF), la razón entre los puntos es equivalente a la razón entre las áreas y a la razón entre los

volúmenes.

Las microestructuras biológicas como capilares, túbulos y axones, pueden considerarse a efectos prácticos, como elementos lineales. El atributo estereológico más importante de estas estructuras lineales es la densidad de longitud (L_v) (L Santamaría y cols., 2009) es decir la longitud de vaso linfático por unidad de volumen del espacio de referencia. En este estudio se ha evaluado la L_v de los microvasos linfáticos intestinales inmunorreactivos para LYVE1, es decir la longitud microvascular por unidad de volumen de tejido intestinal. Se utilizará como espacio de referencia para esta estimación el compartimento estromal.

2.1.4.b. ESTIMACION DE PARAMETROS ESTEREOLOGICOS DE LOS VASOS LINFATICOS INTESTINALES INMUNOTEÑIDOS CON LYVE-1

Se evaluaron los siguientes parámetros, en todos los grupos de animales:

- 1- Fracción de volumen ocupada por los vasos linfáticos ($V_v \text{ vasc}$).

$$V_v \text{ vasc} = \frac{\Sigma \text{ puntos sobre vasos}}{\Sigma \text{ puntos sobre espacio de referencia}}$$

- 2- Densidad de longitud de los vasos (L_v). Se empleó el retículo del disector para muestrear los perfiles vasculares inmunoteñidos y elegibles para ser contados. La densidad de longitud se calculará aplicando la fórmula:

$$L_v = \frac{(2 \times \Sigma Q-)}{\Sigma A}$$

Donde $Q-$ = número de perfiles vasculares inmunopositivos elegibles para conteo siguiendo la convención de Sterio (REF) y ΣA = área total muestreada, es decir: área del retículo del disector multiplicada por el número de retículos seleccionados.

La L_v se expresó en mm^{-2} (mm de longitud de vaso / mm^3 de volumen de referencia).

3- Diámetro vascular medio (dvm) calculado según la fórmula y expresado en μm :

$$dvm = 2 \times 10^3 \times \sqrt{V_v \text{ vasc} / V_v \text{ estroma} \cdot \pi \cdot L_v}$$

Donde:

$V_v \text{ vasc}$: Fracción de volumen ocupada por los vasos

L_v : Densidad de longitud de los vasos

$V_v \text{ estroma}$: fracción de volumen ocupada por el estroma, calculada del siguiente modo:

$$V_v \text{ estroma} = \frac{\Sigma \text{ puntos sobre estroma}}{\Sigma \text{ puntos sobre espacio de referencia}}$$

Los parámetros indicados se estimaron en todos los grupos de animales:

Grupos:

- Pseudo-operados (PSO) (grupo I)
- Colestasis microquirúrgica (CM) (grupo II)
- Colestasis microquirúrgica que recibieron xenotransplante hepático de células madre mesenquimales de origen adipocítico (CMX) (grupo III)

y en los siguientes compartimentos (espacios de referencia):

Localización histológica:

- Mucosa
- Submucosa
- Muscular propia

Y en las siguientes regiones:

- Duodeno

- Yeyuno
- Ileon

Para la realización de Las estimaciones estereológicas se ha utilizado un microscopio Olympus conectado a una videocámara y provisto de una platina motorizada conectada a su vez a un ordenador (Figura 17). El software empleado (Cast-Grid, Interactive Vision, Silkeborg, Dinamarca) permite la selección de los campos microscópicos previa la introducción de una fracción de muestreo y genera las retículas empleadas para el conteo.



Figura 17. Equipo de Estereología (The computer assisted stereological toolbox) The Olympus Denmark C.A.S.T. – Grid system.

2.1.5. ANALISIS ESTADISTICOS

Para el análisis estadístico se utilizó la aplicación informática SPSS versión 21.0 para Windows® (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Se obtuvieron los valores medios \pm SEM, de los parámetros estereológicos indicados en el apartado anterior y de los pesos estimados (peso preoperatorio, peso al sacrificio, hígado, bazo, testículos).

Se realizó ANOVA de 1 factor para estudiar la influencia del tipo de tratamiento y los pesos estimados.

Se efectuaron ANOVA de 2 factores y análisis multivariante (modelo

lineal generalizado) para valorar las siguientes fuentes de variación:

Para el ANOVA de dos factores:

- Tiempo de tratamiento y tipo de tratamiento.
- Tiempo de tratamiento y región de intestino delgado.
- Tiempo de tratamiento y localización histológica.
- Tipo de tratamiento y región de intestino delgado.
- Tipo de tratamiento y localización histológica.

Para el análisis multivariante se incluyeron los efectos siguientes:

- Tipo de tratamiento (Tratamiento)
- Tiempo de tratamiento (Tiempo)
- Región del intestino delgado (Región)
- Localización histológica (Localización)
- Tratamiento * Tiempo
- Tratamiento * Región
- Tratamiento * Localización
- Tiempo * Región
- Tiempo * Localización
- Región * Localización
- Tratamiento * Tiempo * Región
- Tratamiento * Tiempo * Localización
- Tratamiento * Región * Localización
- Tiempo * Región * Localización
- Tratamiento * Tiempo * Región * Localización

Tras el ANOVA, se efectuó una comparación múltiple de medias, mediante el test de Tukey.

En el caso del análisis multivariante, la significación de la influencia de los diversos efectos se estimó según la lambda de Wilks. En cada etapa, el efecto que minimiza la lambda de Wilks o que maximiza la distribución F de Snedecor asociada ($F \geq 1.80$), se considera significativo

El nivel de significación utilizado para todos los análisis efectuados fue $p < 0.05$

IV. RESULTADOS

RESULTADOS

1. SUPERVIVENCIA

La supervivencia global fue del 75%, produciéndose el fallecimiento de 12 de los 48 animales que formaban parte del proyecto, sin que se aprecien diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. La supervivencia por grupos fue: 11 (69%) de las 16 ratas pseudo-operadas (PSO) sobrevivieron hasta el momento del sacrificio, 12 (75%) de las 16 ratas con colestasis microquirúrgica (CM) sobrevivieron hasta el momento del sacrificio, y 13 (81.3%) de las 16 ratas con colestasis microquirúrgica que recibieron xenotrasplante de células madre mesenquimales de origen adipocítico prediferenciadas a hepatocitos (CMX) sobrevivieron hasta el momento del sacrificio. Al momento del sacrificio observamos ictericia, coluria así como acolia en los animales con colestasis microquirúrgica (Figura 18).

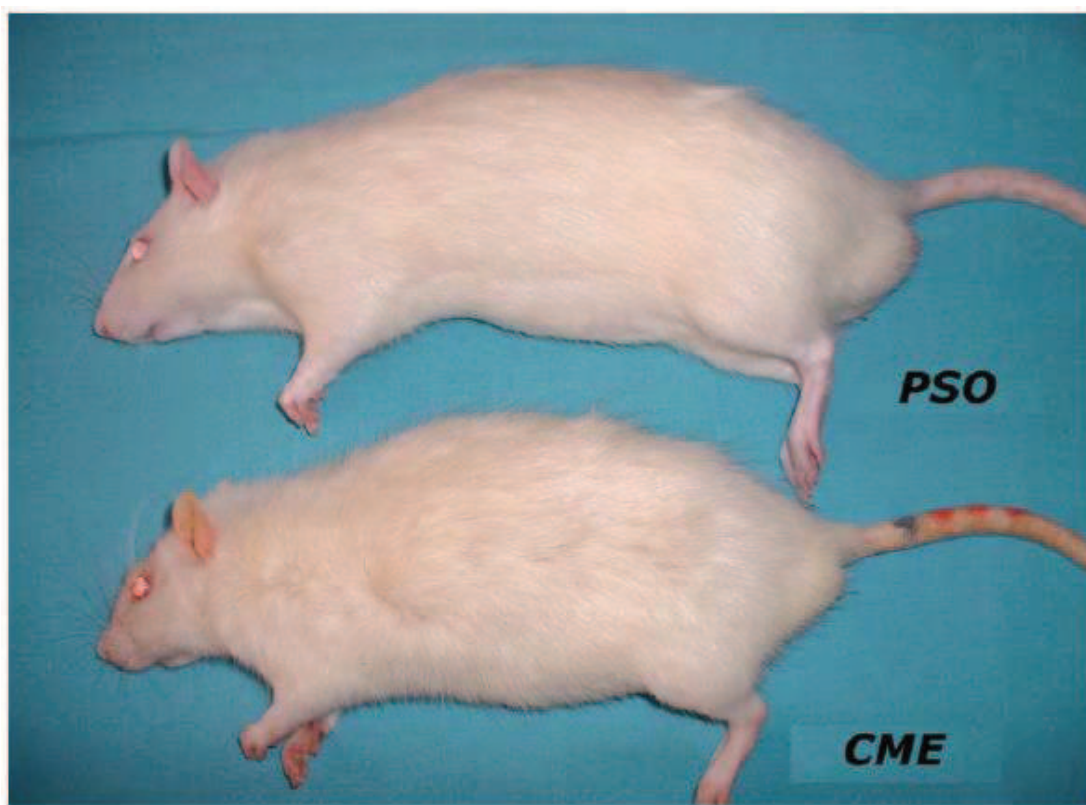


Figura 18. Fotografía comparativa entre una rata del grupo de Pseudo-operada (PSO) y otra del grupo con Colestasis microquirúrgica experimental (CME) al final del periodo de estudio, en la cual se observa la ictericia cutánea, en particular en las orejas, las extremidades y la cola.

2. COMPLICACIONES POST-OPERATORIAS

Las ratas correspondientes a los grupos de colestasis microquirúrgica (CM) y colestasis microquirúrgica que recibieron xenotrasplante hepático de células madre mesenquimales de origen adipocítico prediferenciadas a hepatocitos (CMX), presentaron las

siguientes complicaciones postoperatorias:

- Peritonitis biliar y fallecimiento secundario en 3 casos
- Sepsis originada por infección de la cicatriz de laparotomía en 1 caso
- Eventración de la laparotomía en 3 casos
- Síndrome adherencial moderado

3. ASCITIS

La media del volumen de líquido ascítico encontrada en las ratas colestásicas fue de 2.78 ± 5.16 ml sin que se apreciaran diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos.

4. CIRCULACION COLATERAL PORTO-SISTEMICA

Se han estudiado aquellas áreas donde se desarrolla habitualmente circulación colateral venosa en la rata, es decir en las áreas esplenorrenal (CER), gastroesofágica (colaterales paraesofágicas: CPE), y pararrectal (CPR).

- Área Esplenorrenal: Se forman la vena esplenorrenal craneal (anterior o proximal), y la esplenorrenal caudal (posterior o distal), que drenan a distinta altura en la vena suprarrenal izquierda (figura 19a).
- Área Gastroesofágica: Las colaterales paraesofágicas son dos venas tortuosas y de grueso calibre que ascienden por la cara anterior y posterior del esófago: paraesofágica anterior y posterior (figura 19b).
- Área Colorrectal: Se localiza la vena mesentérica inferior, que se continúa con las venas hemorroidales en situación pararrectal izquierda.

Todas las ratas con colestásicas microquirúrgica presentan circulación colateral al momento del sacrificio sin que se aprecien diferencias significativas entre estas.

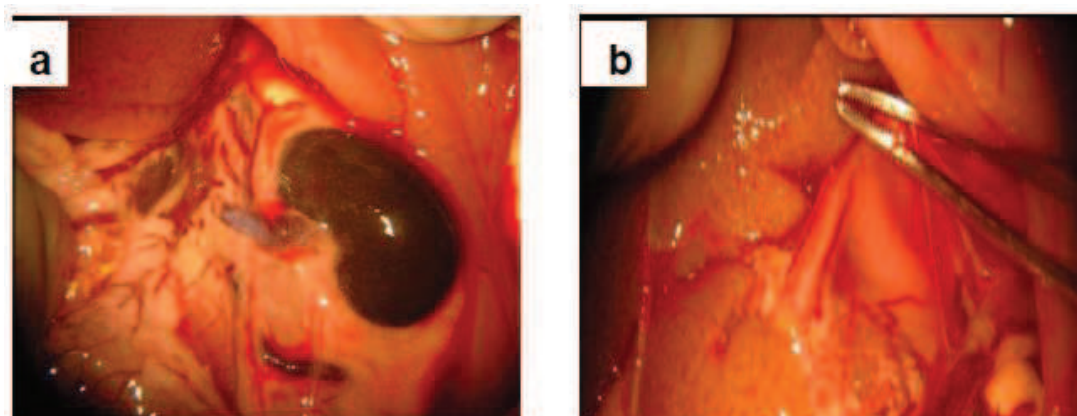


Figura 19. Imagen fotográfica en la que se observa la existencia de circulación colateral venosa esplenorrenal (a) y pasesofágica (b) en una rata con Colestasis microquirúrgica (CM).

5. VASCULOPATIA VENOSA MESENERICA

Los animales pertenecientes al grupo de colestasis microquirúrgica (CM) y colestasis microquirúrgica que recibió xenotrasplante hepático de células madre mesenquimales de origen adipocítico prediferenciadas a hepatocitos (CMX) presentan vasculopatía grado I en todos los casos.

6. EVOLUCION DEL PESO CORPORAL

Los resultados correspondientes al peso corporal de los animales tanto al inicio como al final del estudio, así como el incremento del peso corporal están representadas en las figuras 20 al 22, el aumento del peso corporal fue mayor en el grupo de ratas pseudo-operadas (PSO), siendo este incremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) cuando se compara con los pesos de los otros dos grupos. Sin embargo no encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los pesos de los otros dos grupos, es decir el grupo de colestasis microquirúrgica (CM) y el grupo de colestasis microquirúrgica que recibió xenotrasplante de células madre mesenquimales de origen adipocítico prediferenciados a hepatocitos (CMX)

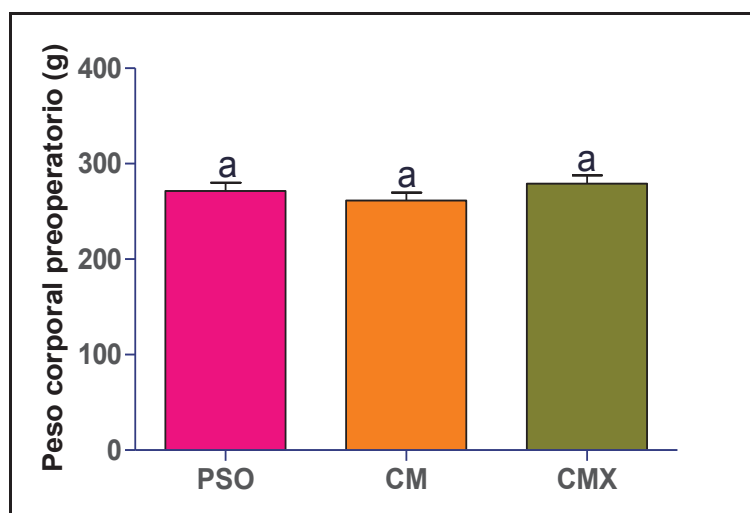


Figura 20. Peso corporal preoperatorio de las ratas. Pseudo-operados (PSO), Colestasis microquirúrgica (CM) y Colestasis microquirúrgica que recibieron un xenotrasplante hepático de células madre mesenquimales de origen adipocítico (CMX). Los resultados se expresan para cada grupo, como valores medios \pm SEM. Las letras sobre las barras de error indican la significación. Barras con letras diferentes difieren significativamente ($p < 0.05$).

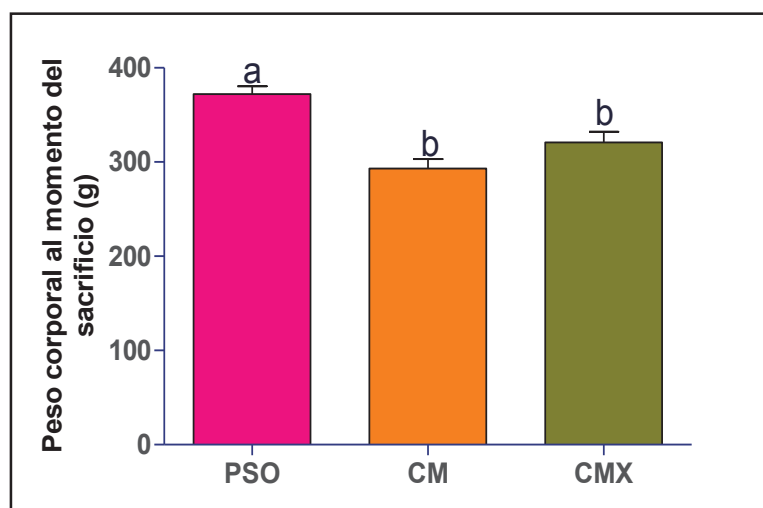


Figura 21. Peso corporal de las ratas al momento del sacrificio. Pseudo-operados (PSO), Colestasis microquirúrgica (CM) y Colestasis microquirúrgica que recibieron un xenotrasplante hepático de células madre mesenquimales de origen adipocítico (CMX). Los resultados se expresan para cada grupo, como valores medios \pm SEM. Las letras sobre las barras de error indican la significación. Barras con letras diferentes difieren significativamente ($p < 0.05$).

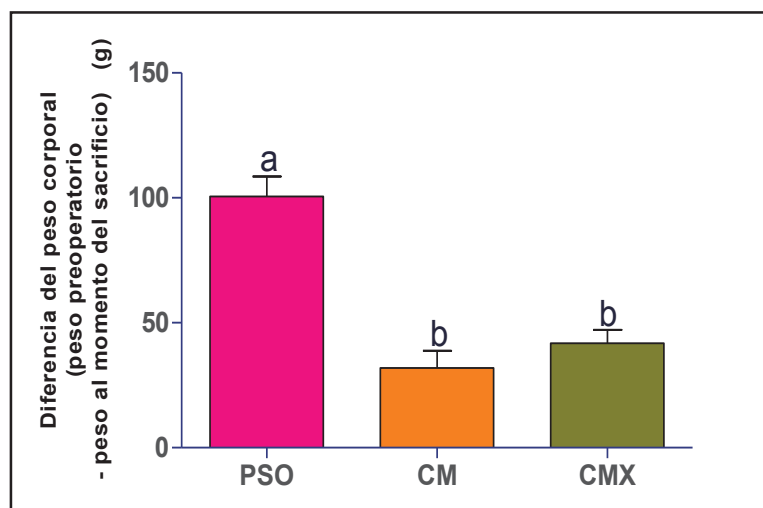


Figura 22. Diferencia del peso corporal (peso preoperatorio – peso al momento del sacrificio). Pseudo-operados (PSO), Colestasis microquirúrgica (CM) y Colestasis microquirúrgica que recibieron un xenotrasplante hepático de células madre mesenquimales de origen adipocítico (CMX). Los resultados se expresan para cada grupo, como valores medios \pm SEM. Las letras sobre las barras de error indican la significación. Barras con letras diferentes difieren significativamente ($p < 0.05$).

7. PESO HEPATICO

Al comparar los pesos hepáticos al momento del sacrificio observamos un mayor peso hepático en el grupo de ratas con colestasis microquirúrgica (CM) seguido del grupo con colestasis microquirúrgica que recibió xenotrasplante hepático de células madre mesenquimales de origen adipocítico (CMX) y por último del grupo de pseudo-operadas (PSO), las diferencias encontradas entre estos tres grupos es estadísticamente significativas ($p < 0.05$) (Figuras 23 y 24).

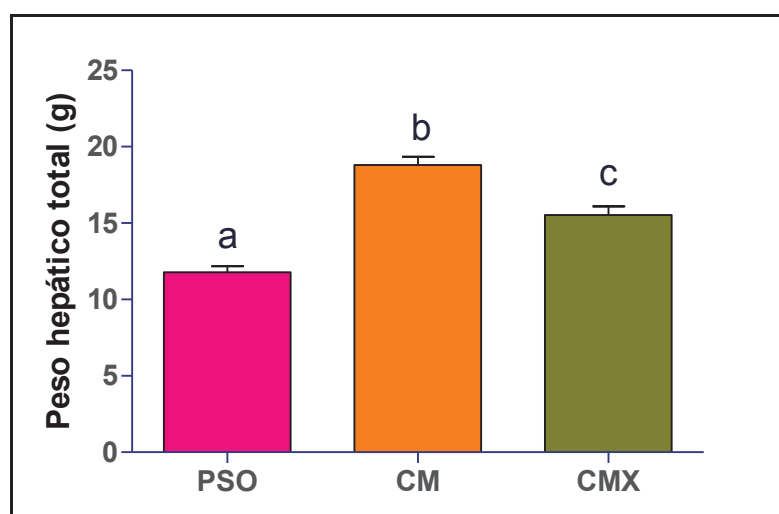


Figura 23. Peso hepático al momento del sacrificio. Pseudo-operados (PSO), Colestasis microquirúrgica (CM) y Colestasis microquirúrgica que recibieron un xenotrasplante hepático de células madre

mesenquimales de origen adipocítico (CMX). Los resultados se expresan para cada grupo, como valores medios \pm SEM. Las letras sobre las barras de error indican la significación. Barras con letras diferentes difieren significativamente ($p < 0.05$).

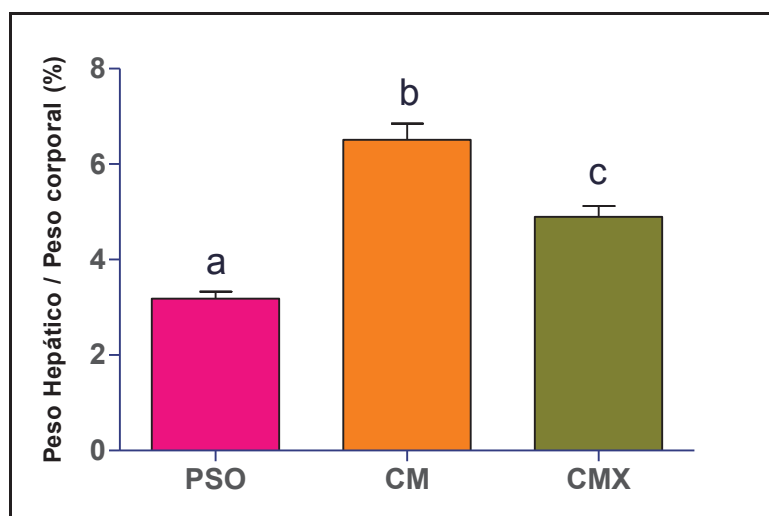


Figura 24. Relación peso hepático / peso corporal $\times 100$ (%). Pseudo-operados (PSO), Colestasis microquirúrgica (CM) y Colestasis microquirúrgica que recibieron un xenotrasplante hepático de células madre mesenquimales de origen adipocítico (CMX). Los resultados se expresan para cada grupo, como valores medios \pm SEM. Las letras sobre las barras de error indican la significación. Barras con letras diferentes difieren significativamente ($p < 0.05$).

Es de interés destacar que la evolución de la hepatomegalia, tanto en valor absoluto, como cuando se estudia la relación peso hepático/peso corporal, es inferior en las ratas con colestasis a las que se les administran por vía intrahepática células madre respecto de aquellas que sólo recibieron suero salino (Figuras 23 y 24). En la figura 25 se puede apreciar el aspecto macroscópico del hígado de una rata con colestasis microquirúrgica que recibió xenotrasplante de células madre mesenquimales de origen adipocítico (CMX) y de una rata con colestasis microquirúrgica (CM).

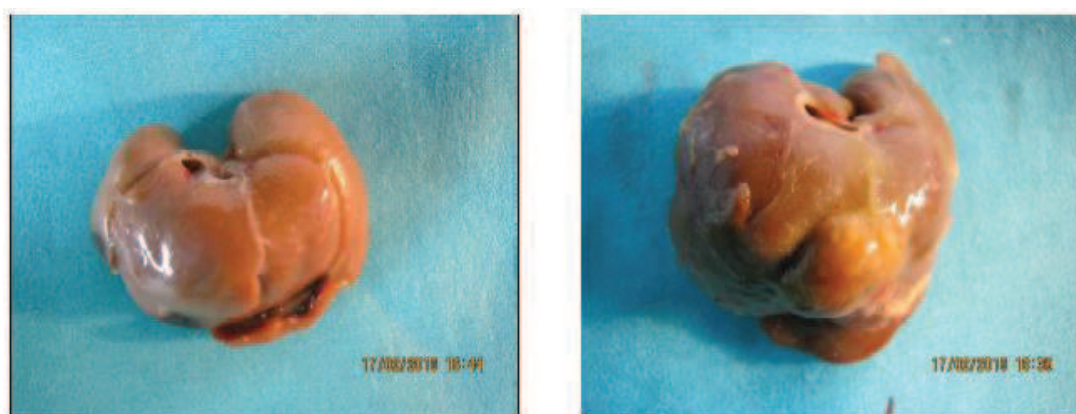


Figura 25. Fotografía comparativa del aspecto macroscópico del hígado de una rata con colestasis microquirúrgica que recibió un xenotrasplante hepático de células madre mesenquimales de origen

adipocítico (CMX) (izquierda) y otra del grupo de colestasis microquirúrgica (CM) (derecha). Se aprecia hepatomegalia, ictericia y aumento de la consistencia en el hígado en mayor grado en la rata con colestasis microquirúrgica (CM).

8. PESO ESPLÉNICO

Al evaluar el peso esplénico observamos un mayor peso en el grupo de ratas con colestasis microquirúrgica (CM), seguido del grupo de colestasis microquirúrgica que recibió xenotrasplante hepático de células madre mesenquimales de origen adipocítico prediferenciadas a hepatocitos (CMX) y finalmente el grupo de pseudo-operadas (PSO), las diferencias encontradas fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tres grupos (Figuras 26-27).

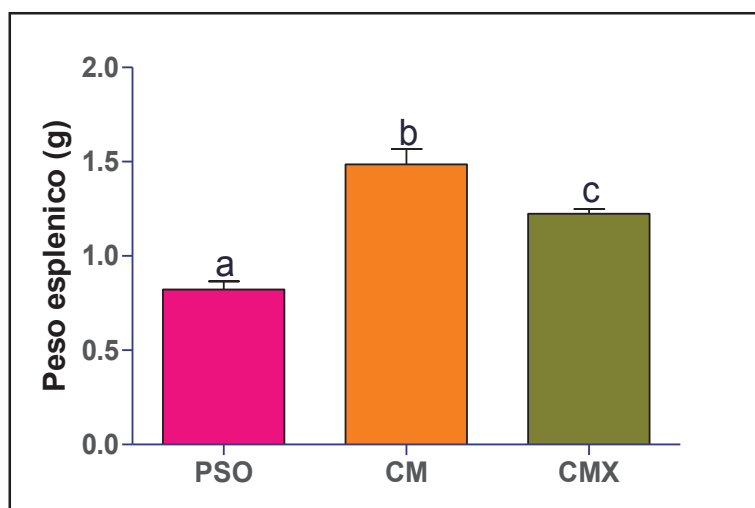


Figura 26. Peso esplénico al momento del sacrificio. Pseudo-operados (PSO), Colestasis microquirúrgica (CM) y Colestasis microquirúrgica que recibieron un xenotrasplante hepático de células madre mesenquimales de origen adipocítico (CMX). Los resultados se expresan para cada grupo, como valores medios \pm SEM. Las letras sobre las barras de error indican la significación. Barras con letras diferentes difieren significativamente ($p < 0.05$)

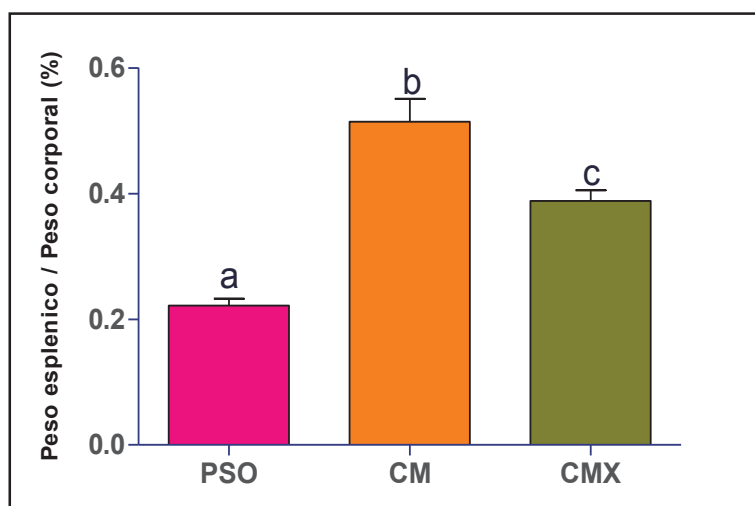


Figura 27. Relación peso esplénico / peso corporal x 100 (%). Pseudo-operados (PSO), Colestasis microquirúrgica (CM) y Colestasis microquirúrgica que recibieron un xenotrasplante hepático de células madre mesenquimales de origen adipocítico (CMX). Los resultados se expresan para cada grupo, como valores medios \pm SEM. Las letras sobre las barras de error indican la significación. Barras con letras diferentes difieren significativamente ($p < 0.05$)

Al igual que ocurría con la hepatomegalia, el incremento del peso esplénico es inferior en las ratas con colestásicas microquirúrgica que recibieron xenotrasplante de células madre mesenquimales de origen adipocítico (CMX) respecto de aquellas a las que se inyectó sólo suero salino intrahepático (Figura 26). Además, mientras se produce un aumento de la relación PE/PC en el grupo que recibió suero salino, en el grupo tratado con células madre se observó un descenso de la relación PE/PC (figura 27). En la figura 28 se puede apreciar el aspecto macroscópico del bazo de una rata con colestasis microquirúrgica (CM) y otra con colestasis microquirúrgica que recibió xenotrasplante de células madre mesenquimales de origen adipocítico (CMX).

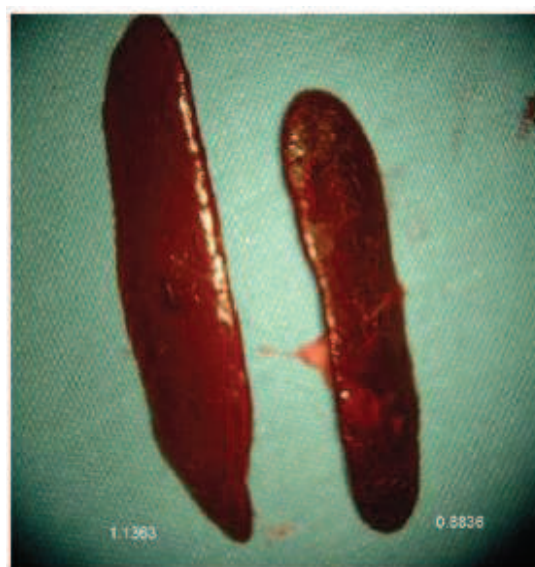


Figura 28. Fotografía comparativa del tamaño del bazo de una rata con colestasis microquirúrgica (CM) y de otra con colestasis microquirúrgica que recibió un xenotrasplante hepático de células madre mesenquimales de origen adipocítico (CMX)

9. PESO TESTICULAR

Al evaluar el peso testicular observamos un menor peso en el grupo de ratas sometido a colestasis microquirúrgica (CM), seguido del grupo de colestasis microquirúrgica que recibió xenotrasplante hepático de células madre mesenquimales de origen adipocítico prediferenciadas a hepatocitos (CMX) y finalmente el grupo de pseudo-operadas (PSO), las diferencias encontradas fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tres grupos

(Figuras 29-30).

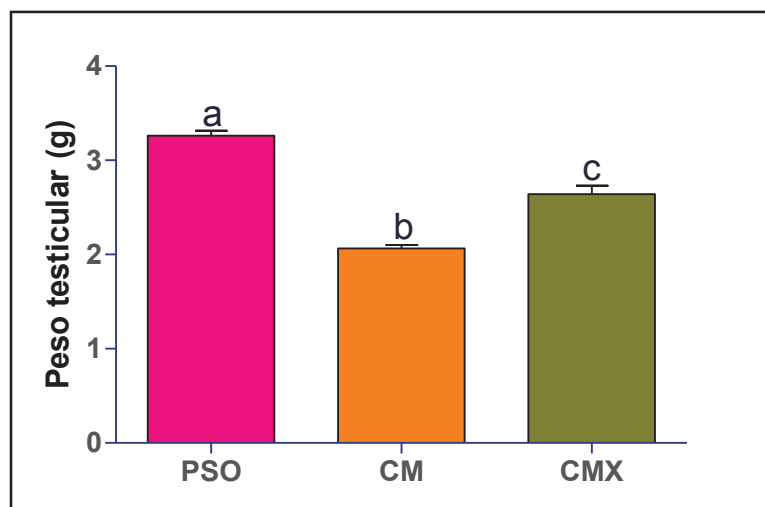


Figura 29. Peso testicular al momento del sacrificio. Pseudo-operados (PSO), Colestasis microquirúrgica (CM) y Colestasis microquirúrgica que recibieron un xenotrasplante hepático de células madre mesenquimales de origen adipocítico (CMX). Los resultados se expresan para cada grupo, como valores medios \pm SEM. Las letras sobre las barras de error indican la significación. Barras con letras diferentes difieren significativamente ($p < 0.05$)

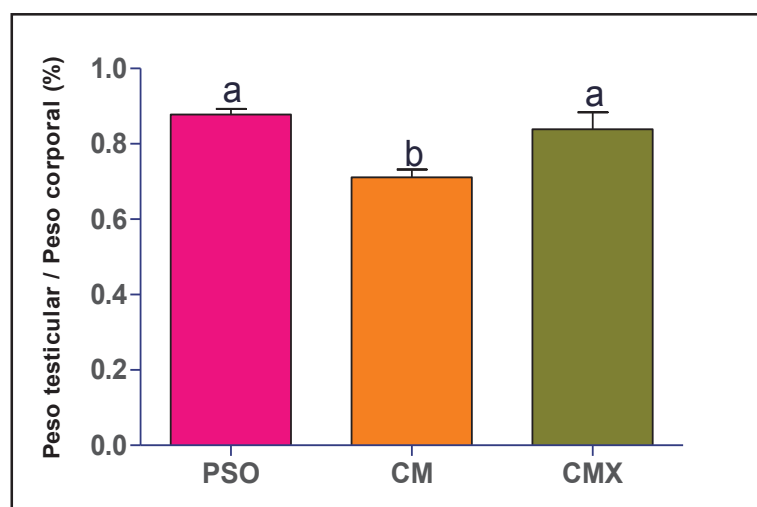


Figura 30. Relación del peso testicular / peso corporal $\times 100$ (%). Pseudo-operados (PSO), Colestasis microquirúrgica (CM) y Colestasis microquirúrgica que recibieron un xenotrasplante hepático de células madre mesenquimales de origen adipocítico (CMX). Los resultados se expresan para cada grupo, como valores medios \pm SEM. Las letras sobre las barras de error indican la significación. Barras con letras diferentes difieren significativamente ($p < 0.05$)

En la figura 31 se puede apreciar el aspecto macroscópico del testículo de una rata del grupo de pseudo-operadas (PSO) y otras del grupo con colestasis microquirúrgica (CM).

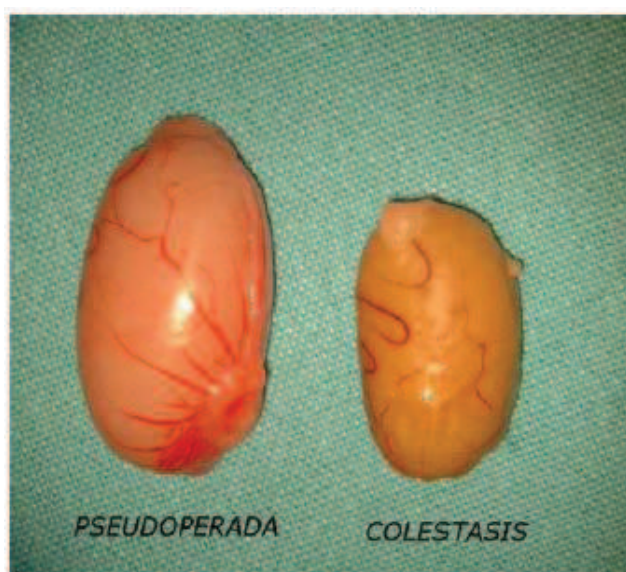


Figura 31. Fotografía comparativa del tamaño testicular de una rata del grupo de pseudo-operada (PSO) y otra del grupo de colestasis microquirúrgica (CM).

10. VASOS LINFATICOS

Analizamos la densidad de longitud (L_v), la fracción de volumen (V_v) ocupada por los microvasos y el diámetro vascular medio (d_{vm}) de los microvasos linfáticos del intestino delgado. El análisis se realizó en las tres regiones (duodeno, yeyuno e íleon) del intestino, y por compartimentos histológicos (mucosa, submucosa y muscular).

Los parámetros indicados se evaluaron en los diversos grupos experimentales. Inicialmente se estudiaron a las 5 y a las 8 semanas de evolución. El ANOVA de dos vías para detectar la influencia de los tiempos de tratamiento en la estimación de los parámetros estereológicos según tipo de tratamiento, compartimento histológico y región de intestino delgado considerada, revelaron la ausencia de influencia significativa ($p < 0.05$) del factor tiempo (Tablas 2-4). Para aquilatar más la influencia conjunta de los distintos factores que intervienen en el modelo experimental sobre los parámetros estereológicos estudiados, se efectuó un análisis multivariante, que confirmó la ausencia de influencia significativa del factor tiempo ($p < 0.05$) sobre la evolución de las variables estereológicas (Tabla 5).

A la vista de estos resultados, se decidió prescindir de ese factor en el estudio posterior, clasificando a los animales en un solo grupo independiente del tiempo de evolución.

VARIABLE	TIEMPO DE TRATAMIENTO	TIPO DE TRATAMIENTO	INTERACCIÓN
L _v vasos	0.578	<0.0001***	0.738
V _v vasos	0.311	<0.0001***	0.561
Dvm	0.940	0.719	0.096

Tabla 2. Resumen de los valores de P para cada variable estudiada para los dos factores (tiempo y tipo de tratamiento) considerados. (*) diferencias significativas; (**) diferencias muy significativas; (***) diferencias altamente significativas.

VARIABLE	TIEMPO DE TRATAMIENTO	REGIÓN DE INTESTINO	INTERACCIÓN
L _v vasos	0.706	0.182	0.646
V _v vasos	0.252	0.037*	0.736
Dvm	0.755	0.527	0.744

Tabla 3. Resumen de los valores de P para cada variable estudiada para los dos factores (tiempo de tratamiento y región de intestino delgado) considerados. (*) diferencias significativas; (**) diferencias muy significativas; (***) diferencias altamente significativas.

VARIABLE	TIEMPO DE TRATAMIENTO	LOCALIZACIÓN HISTOLÓGICA	INTERACCIÓN
L _v vasos	0.591	<0.0001***	0.981
V _v vasos	0.140	<0.0001***	0.016*
Dvm	0.961	<0.0001***	0.475

Tabla 4. Resumen de los valores de P para cada variable estudiada para los dos factores (tiempo de tratamiento y localización histológica) considerados. (*) diferencias significativas; (**) diferencias muy significativas; (***) diferencias altamente significativas.

Efecto	λ^b	F ^c	p ^d
Tratamiento	0.451	34.534	<0.0005
Tiempo	0.982	1.275	0.284
Región	0.893	4.111	0.001
Localización	0.121	132.243	<0.0005
Tratamiento*Tiempo	0.954	1.690	0.122
Tratamiento*Región	0.760	5.124	<0.0005
Tratamiento*Localización	0.417	18.314	<0.0005
Tiempo*Región	0.958	1.533	0.166
Tiempo*Localización	0.929	2.633	0.016
Región*Localización	0.754	5.255	<0.0005
Tratamiento*Tiempo*Región	0.862	2.711	0.001
Tratamiento*Tiempo*Localización	0.886	2.194	0.011
Tratamiento*Región*Localización	0.796	2.101	0.002
Tiempo*Región*Localización	0.892	2.057	0.018
Tratamiento*Tiempo*Región*Localización	0.839	1.827	0.014

Tabla 5. Se expresa el contraste multivariante para el análisis de un modelo lineal generalizado en el que se incluyen los efectos indicados en la columna^a. ^bEsta columna muestra el valor de la lambda de Wilks para cada efecto introducido. ^cDistribución F de Snedecor, el valor mínimo de F para admitir la significación de un efecto fue 1.800. ^dSe indica la significación, el efecto fue considerado significativo cuando $p < 0.05$.

10.1. DENSIDAD DE LONGITUD

Realizamos un análisis global de la densidad de longitud de los vasos linfáticos según el tipo de tratamiento recibido, observamos una mayor densidad de longitud de los microvasos linfáticos en el grupo de colestasis microquirúrgica (CM), seguido del grupo de colestasis microquirúrgica que recibió un xenotrasplante hepático de células madre mesenquimatosas de origen adipocítico (CMX) y por último el grupo de pseudo-operadas (PSO), encontrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tres grupos (Figura 32).

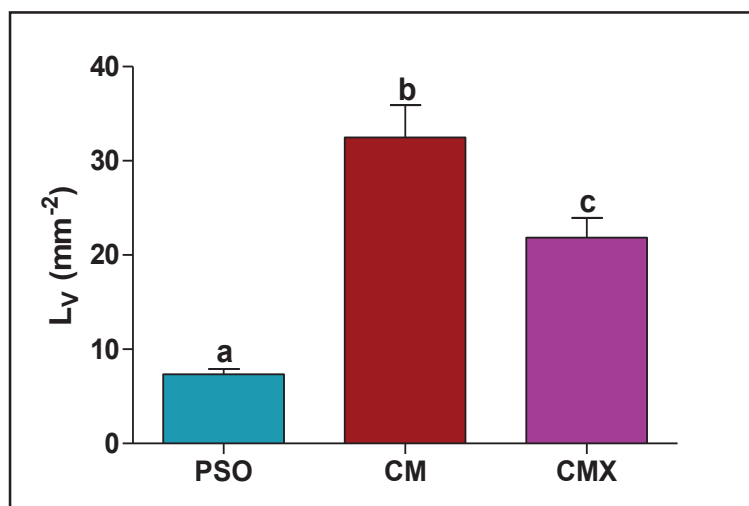


Figura 32. Densidad de longitud (L_v) mm^{-2} de los vasos linfáticos en el intestino de las ratas según el tipo de tratamiento recibido. Pseudo-operados (PSO), Colestasis microquirúrgica (CM) y Colestasis microquirúrgica que recibieron un xenotrasplante hepático de células madre mesenquimales de origen adipocítico (CMX). Los resultados se expresan para cada grupo, como valores medios \pm SEM. Las letras sobre las barras de error indican la significación. Barras con letras diferentes difieren significativamente ($p < 0.05$)

Realizamos un análisis global de la densidad de longitud (L_v) de los vasos linfáticos según las regiones (duodeno, yeyuno e íleon) del intestino delgado, observamos que la L_v de los vasos linfático fue ligeramente menor a nivel de yeyuno al compararla con el duodeno e íleon, pero las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas (Figura 33).

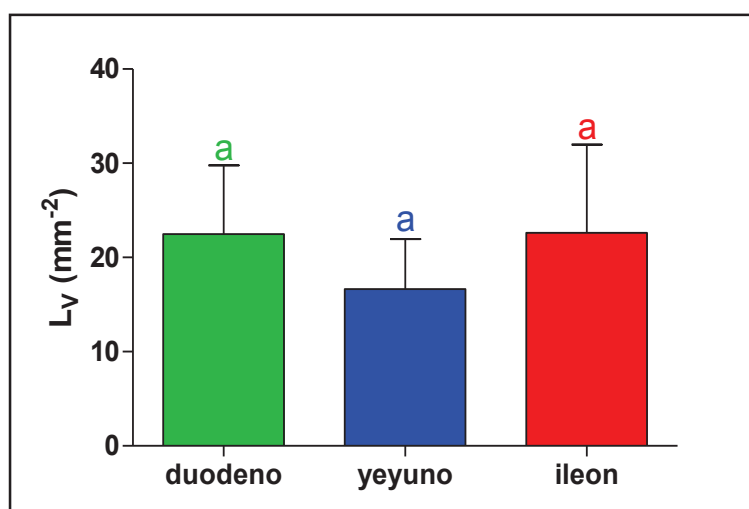


Figura 33. Densidad de longitud (L_v) en mm^{-2} de los vasos linfáticos según la región del intestino delgado. Los resultados se expresan para cada grupo, como valores medios \pm SEM. Las letras sobre las barras de error indican la significación. Barras con letras diferentes difieren significativamente ($p < 0.05$)

Al analizar la densidad de longitud de los vasos linfáticos en las regiones del intestino (duodeno, yeyuno e íleon) según el tipo de tratamiento recibido, observamos que el grupo de ratas pseudo-operadas (PSO) presento una menor densidad de longitud de los vasos linfáticos en las todas las regiones del intestino con respecto a los grupos de colestasis microquirúrgica (CM) y el grupo de colestasis microquirúrgica que recibió un xenotrasplante hepático de células madre mesenquimatosas de origen adipocítico (CMX), estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Sin embargo cuando analizamos la densidad de longitud de los vasos linfáticos en las regiones del intestino entre las ratas del grupo con colestasis microquirúrgica (CM) y las ratas del grupo de colestasis microquirúrgica que recibió xenotrasplante hepático de células madre mesenquimatosas de origen adipocítico (CMX), solo encontramos diferencias estadísticamente ($p < 0.05$) significativas a nivel del íleon (Figura 34, 47b, 47e y 47h).

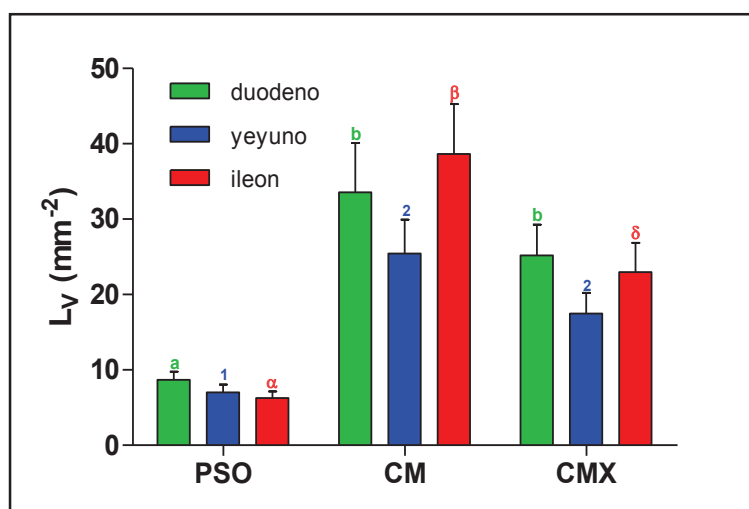


Figura 34. Densidad de longitud (L_v) mm^{-2} de los vasos linfáticos en el intestino delgado por regiones (duodeno, yeyuno e íleon) y según el tipo de tratamiento recibido. Pseudo-operados (PSO), Colestasis microquirúrgica (CM) y Colestasis microquirúrgica que recibieron un xenotrasplante hepático de células madre mesenquimales de origen adipocítico (CMX). Los resultados se expresan para cada grupo, como valores medios \pm SEM. Las letras sobre las barras de error indican la significación. Barras con letras diferentes difieren significativamente ($p < 0.05$)

Realizamos un análisis global de la L_v de los vasos linfáticos según los compartimentos histológicos (mucosa, submucosa y muscular), encontramos una mayor densidad de longitud en la capa mucosa, seguido de la submucosa y finalmente en la muscular. La diferencias encontradas fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$) (Figura 35).

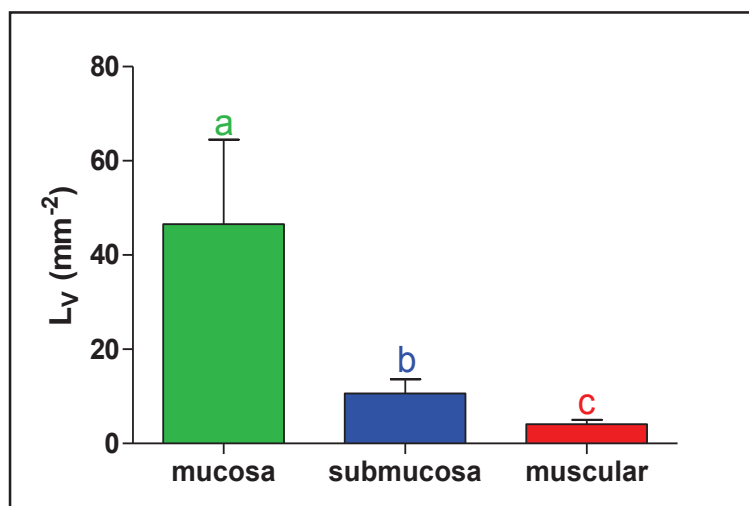


Figura 35. Densidad de longitud (L_v) en mm^{-2} de los vasos linfáticos según las capas del intestino delgado (mucosa, submucosa y muscular). Los resultados se expresan para cada grupo, como valores medios \pm SEM. Las letras sobre las barras de error indican la significación. Barras con letras diferentes difieren significativamente ($p < 0.05$)

Al analizar la L_v de los vasos linfáticos en los diversos compartimentos histológicos (mucosa, submucosa y muscular) y según el tipo de tratamiento recibido, observamos que a nivel de la mucosa, la mayor densidad de longitud de los vasos linfáticos se encuentra en el grupo de colestasis microquirúrgica (CM), seguido del grupo de colestasis microquirúrgica que recibió un xenotrasplante hepático de células madre mesenquimatosas de origen adipocítico (CMX), y por último el grupo de pseudo-operadas (PSO), las diferencias entre los tres grupos fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$)

A nivel de la submucosa encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) cuando comparamos el grupo de pseudo-operadas (PSO) con los otros dos grupos. A nivel de la capa muscular no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos (figura 36, 47c, 47e y 47h).

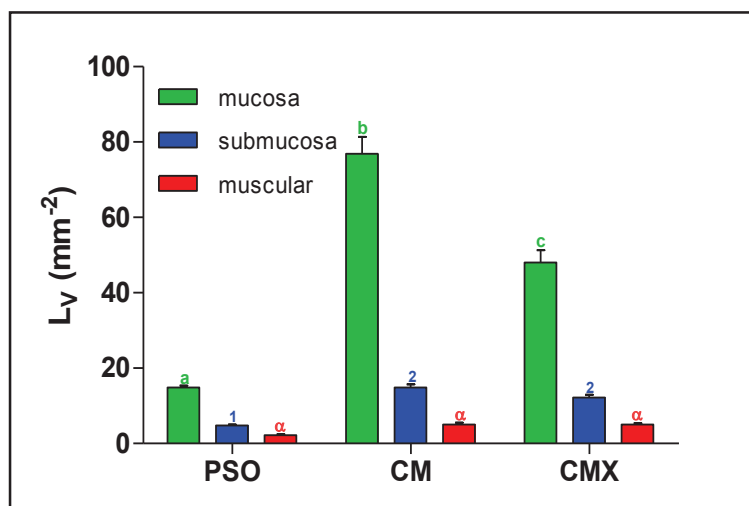


Figura 36. Densidad de longitud (L_v) en mm^{-2} de los vasos linfáticos según las capas del intestino delgado (mucosa, submucosa y muscular) y el tipo de tratamiento recibido. Pseudo-operados (PSO), Colestasis microquirúrgica (CM) y Colestasis microquirúrgica que recibieron un xenotrasplante hepático de células madre mesenquimales de origen adipocítico (CMX). Los resultados se expresan para cada grupo, como valores medios \pm SEM. Las letras sobre las barras de error indican la significación. Barras con letras diferentes difieren significativamente ($p < 0.05$)

10.2. FRACCION DE VOLUMEN

El segundo parámetro analizado fue la fracción de volumen (V_v vasos) ocupada por los vasos linfáticos. Hicimos un análisis general de la fracción de volumen vascular según el tipo de tratamiento recibido, encontramos una mayor fracción de volumen de los vasos linfáticos en el grupo de ratas con colestasis microquirúrgica (CM) seguido del grupo de colestasis microquirúrgica que recibió un xenotrasplante hepático de células madre mesenquimatosas de origen adipocítico (CMX) y por último en el grupo de pseudo-operadas (PSO). Encontrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tres grupos (figura 37).

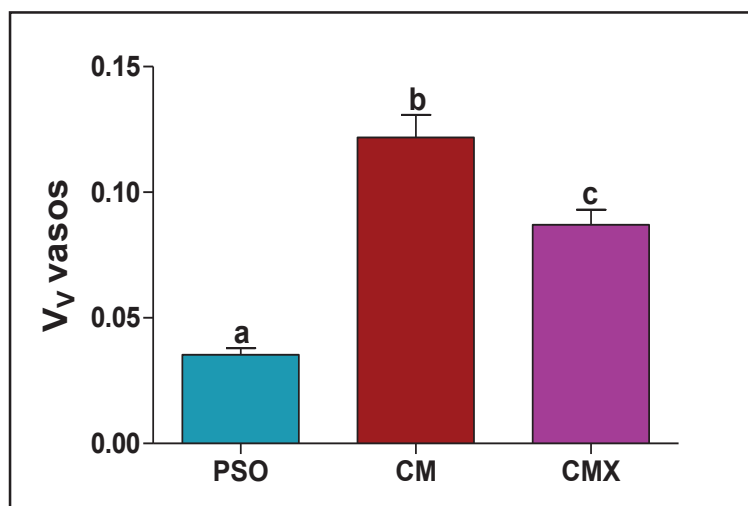


Figura 37. Fracción de volumen (V_v vasos) de los vasos linfáticos en el intestino delgado según el tipo de tratamiento recibido. Pseudo-operados (PSO), Colestasis microquirúrgica (CM) y Colestasis microquirúrgica que recibieron un xenotrasplante hepático de células madre mesenquimales de origen adipocítico (CMX). Los resultados se expresan para cada grupo, como valores medios \pm SEM. Las letras sobre las barras de error indican la significación. Barras con letras diferentes difieren significativamente ($p < 0.05$)

Hicimos un análisis global de V_v de los vasos linfáticos según la región del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon). Encontramos una mayor fracción de volumen en el íleon, seguido del duodeno y por último en el yeyuno. Las diferencias encontradas fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre yeyuno e íleon pero no entre el duodeno y el resto de las regiones (figura 38).

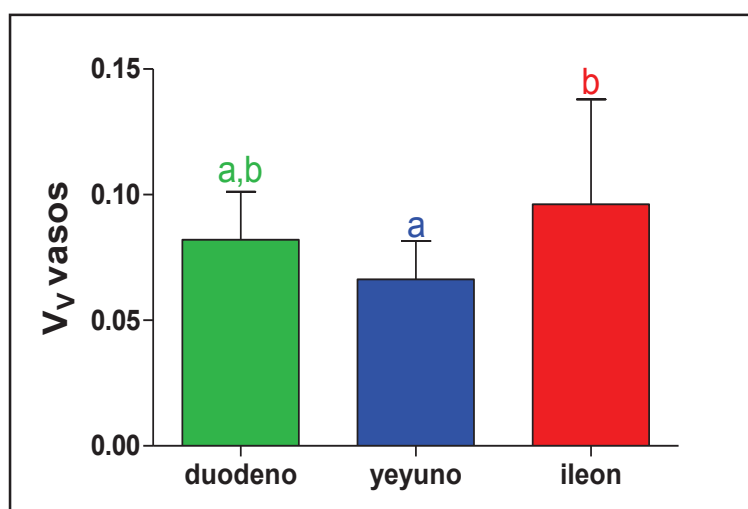


Figura 38. Fracción de volumen (V_v vasos) de los vasos linfáticos según regiones del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon). Los resultados se expresan para cada grupo, como valores medios \pm SEM. Las letras sobre las barras de error indican la significación. Barras con letras diferentes difieren significativamente ($p < 0.05$)

Al analizar la fracción de volumen de los vasos linfáticos según las regiones del intestino (duodeno, yeyuno e íleon) y según el tipo de tratamiento recibido, observamos un mayor aumento de V_v de los vasos linfáticos en las tres regiones (duodeno, yeyuno e íleon) del intestino en el grupo de colestasis microquirúrgica (CM) seguido del grupo de colestasis microquirúrgica que recibió un xenotrasplante hepático de células mesenquimatosas de origen adipocítico (CMX) y por último en el grupo de pseudo-operadas (PSO). Las diferencias encontradas fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tres grupos y en las tres regiones del intestino. Cabe destacar que el aumento de la fracción de volumen de los vasos linfáticos fue más llamativo a nivel de íleon seguido del duodeno (Figura 39, 47b, 47e y 47h).

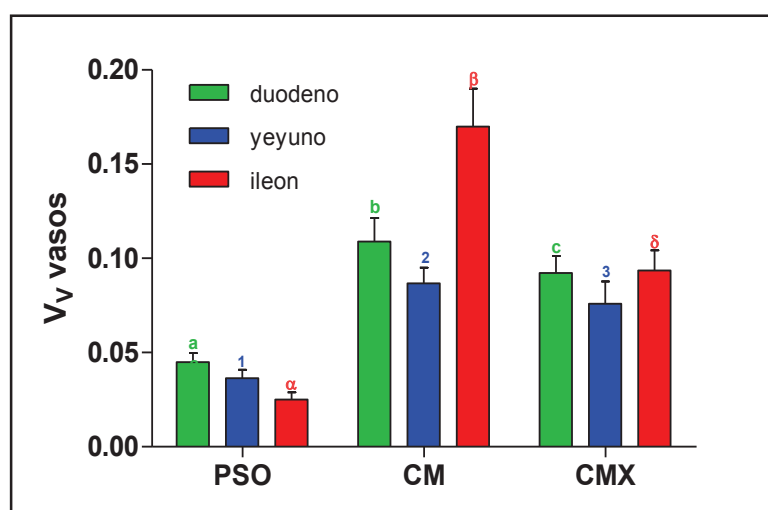


Figura 39. Fracción de volumen (V_v vasos) de los vasos linfáticos según región del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) y según el tipo de tratamiento recibido. Pseudo-operados (PSO), Colestasis microquirúrgica (CM) y Colestasis microquirúrgica que recibieron un xenotrasplante hepático de células madre mesenquimales de origen adipocítico (CMX). Los resultados se expresan para cada grupo, como valores medios \pm SEM. Las letras sobre las barras de error indican la significación. Barras con letras diferentes difieren significativamente ($p < 0.05$)

Hicimos un análisis general de la fracción de volumen ocupada por los vasos linfáticos por compartimentos histológicos (mucosa, submucosa y muscular), encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entra la capa muscular cuando la comparamos con la mucosa y submucosa, sin embargo la diferencia no fue significativa entre las capas mucosa y submucosa (figura 40).

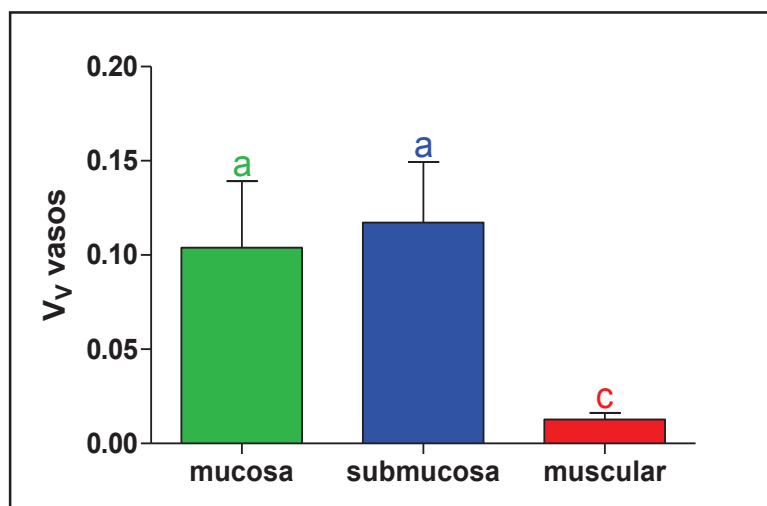


Figura 40. Fracción de volumen (V_v vasos) de los vasos linfáticos según las capas del intestino delgado (mucosa, submucosa y muscular). Los resultados se expresan para cada grupo, como valores medios \pm SEM. Las letras sobre las barras de error indican la significación. Barras con letras diferentes difieren significativamente ($p < 0.05$)

Al analizar la fracción de volumen vascular de los vasos linfáticos por capas (mucosa, submucosa e íleon) y según el tipo de tratamiento recibido, observamos en las capas mucosa y submucosa un mayor aumento de V_v en el grupo de colestasis microquirúrgica (CM) seguido del grupo de colestasis microquirúrgica que recibió un xenotrasplante hepático de células madre mesenquimatosas de origen adipocítico (CMX) y por último en el grupo de pseudo-oepradas (PSO), estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tres grupos. Sin embargo a nivel de la capa muscular no encontramos diferencias significativas entre ningún grupo (Figura 41, 47e y 47h).

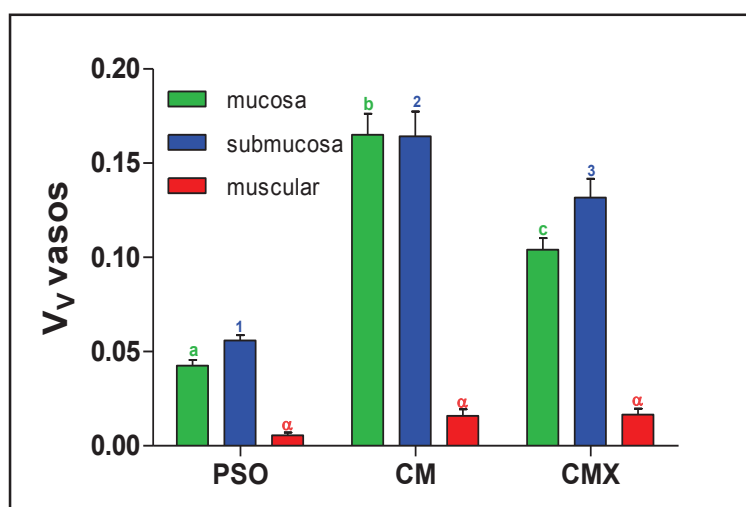


Figura 41. Fracción de volumen (V_v vasos) de los vasos linfáticos según las capas del intestino delgado (mucosa, submucosa y muscular) y según el tipo de tratamiento recibido. Pseudo-operados (PSO),

Colestasis microquirúrgica (CM) y Colestasis microquirúrgica que recibieron un xenotrasplante hepático de células madre mesenquimales de origen adipocítico (CMX). Los resultados se expresan para cada grupo, como valores medios \pm SEM. Las letras sobre las barras de error indican la significación. Barras con letras diferentes difieren significativamente ($p < 0.05$)

10.3. DIAMETRO VASCULAR MEDIO

El tercer parámetro analizado fue el diámetro vascular medio (dvm). Primero hicimos un análisis general del dvm por grupos de tratamiento recibido. No encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tres grupos (Figura 42)

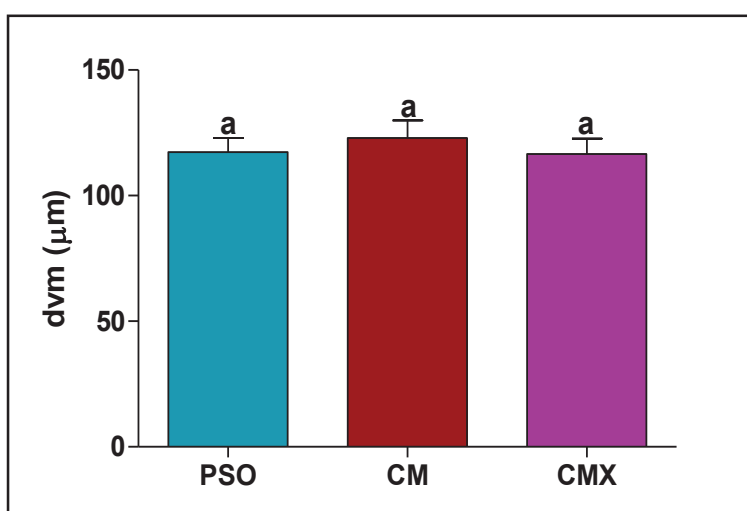


Figura 42. Diámetro vascular medio (dvm) expresado en μm de los vasos linfáticos en el intestino delgado según el tipo de tratamiento recibido. Pseudo-operados (PSO), Colestasis microquirúrgica (CM) y Colestasis microquirúrgica que recibieron un xenotrasplante hepático de células madre mesenquimales de origen adipocítico (CMX). Los resultados se expresan para cada grupo, como valores medios \pm SEM. Las letras sobre las barras de error indican la significación. Barras con letras diferentes difieren significativamente ($p < 0.05$)

Hicimos un análisis global del diámetro vascular medio de los vasos linfáticos según las diferentes regiones del intestino sin tener en cuenta el tipo de tratamiento recibido. No encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tres grupos (Figura 43).

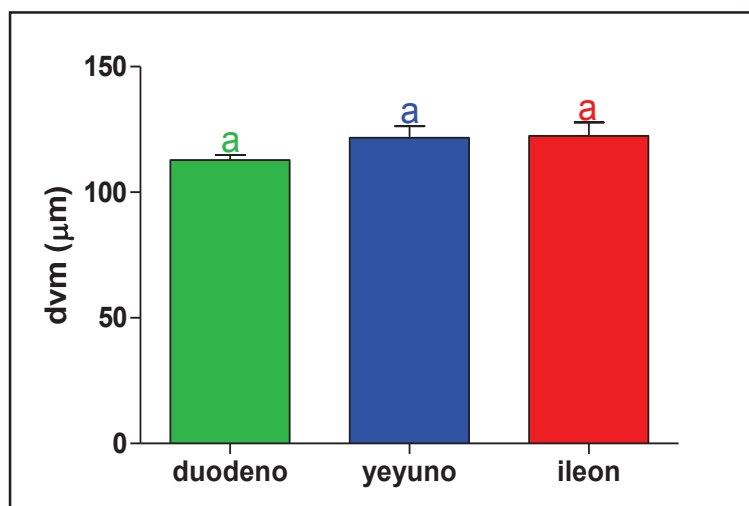


Figura 43. Diámetro vascular medio (dvm) expresado en μm de los vasos linfáticos según las diferentes regiones del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon). Los resultados se expresan para cada grupo, como valores medios \pm SEM. Las letras sobre las barras de error indican la significación. Barras con letras diferentes difieren significativamente ($p < 0.05$)

Al analizar el dvm de los vasos linfáticos por regiones (duodeno, yeyuno e íleon) del intestino delgado y según el tipo de tratamiento recibido, no encontramos diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tres grupos (Figura 44).

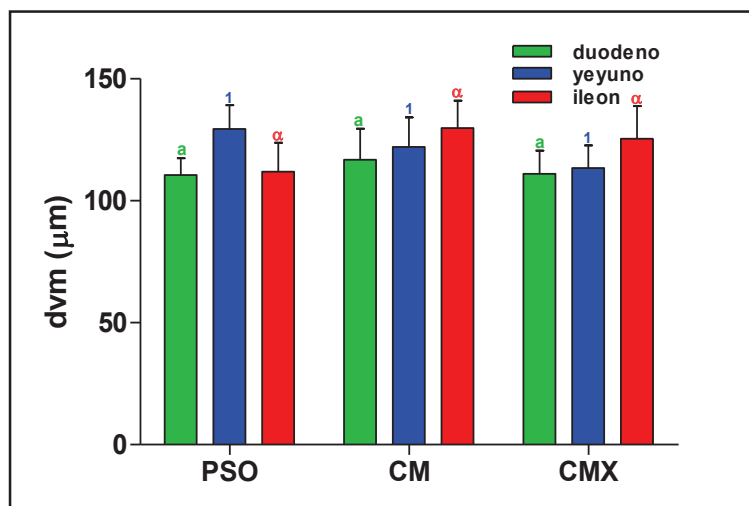


Figura 44. Diámetro vascular medio (dvm) expresado en μm de los vasos linfáticos según las regiones del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) y según el tipo de tratamiento recibido. Pseudo-operados (PSO), Colestasis microquirúrgica (CM) y Colestasis microquirúrgica que recibieron un xenotrasplante hepático de células madre mesenquimales de origen adipocítico (CMX). Los resultados se expresan para cada grupo, como valores medios \pm SEM. Las letras sobre las barras de error indican la significación. Barras con letras diferentes difieren significativamente ($p < 0.05$)

Realizamos un análisis global del dvm de los vasos linfáticos por compartimentos histológicos (mucosa, submucosa y muscular) del intestino delgado.

Encontramos un mayor dvm en la capa submucosa seguida de la capa muscular y por último de la capa mucosa. Encontrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las tres capas (Figura 45).

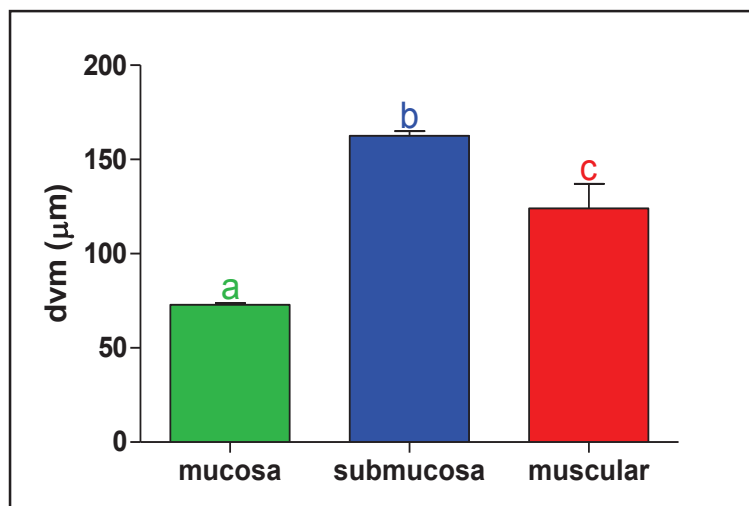


Figura 45. Diámetro vascular medio (dvm) expresado en μm de los vasos linfáticos por compartimentos histológicos (mucosa, submucosa e íleon) del intestino delgado. Los resultados se expresan para cada grupo, como valores medios \pm SEM. Las letras sobre las barras de error indican la significación. Barras con letras diferentes difieren significativamente ($p < 0.05$)

Al analizar el diámetro vascular medio de los vasos linfáticos por compartimento histológicos (mucosa, submucosa e íleon) del intestino delgado y según el tipo de tratamiento recibido, a nivel mucoso y submucoso no encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tres grupos.

A nivel de la capa muscular si encontramos diferencias significativas entre el grupo de pseudo-operadas (PSO) y los otros dos grupos, pero no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los otros dos grupos (Figura 46).

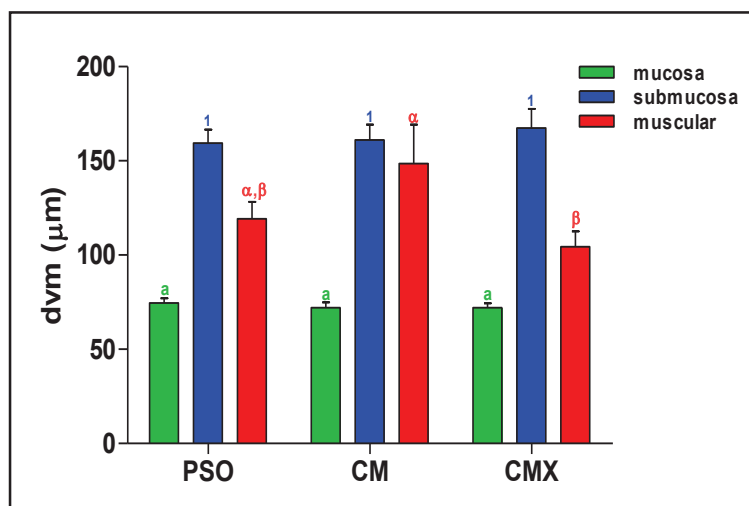


Figura 46. Diámetro vascular medio (dvm) expresado en μm de los vasos linfáticos por compartimentos histológicos (mucosa, submucosa e íleon) del intestino delgado. Pseudo-operados (PSO), Colestasis microquirúrgica (CM) y Colestasis microquirúrgica que recibieron un xenotrasplante hepático de células madre mesenquimales de origen adipocítico (CMX). Los resultados se expresan para cada grupo, como valores medios \pm SEM. Las letras sobre las barras de error indican la significación. Barras con letras diferentes difieren significativamente ($p < 0.05$)

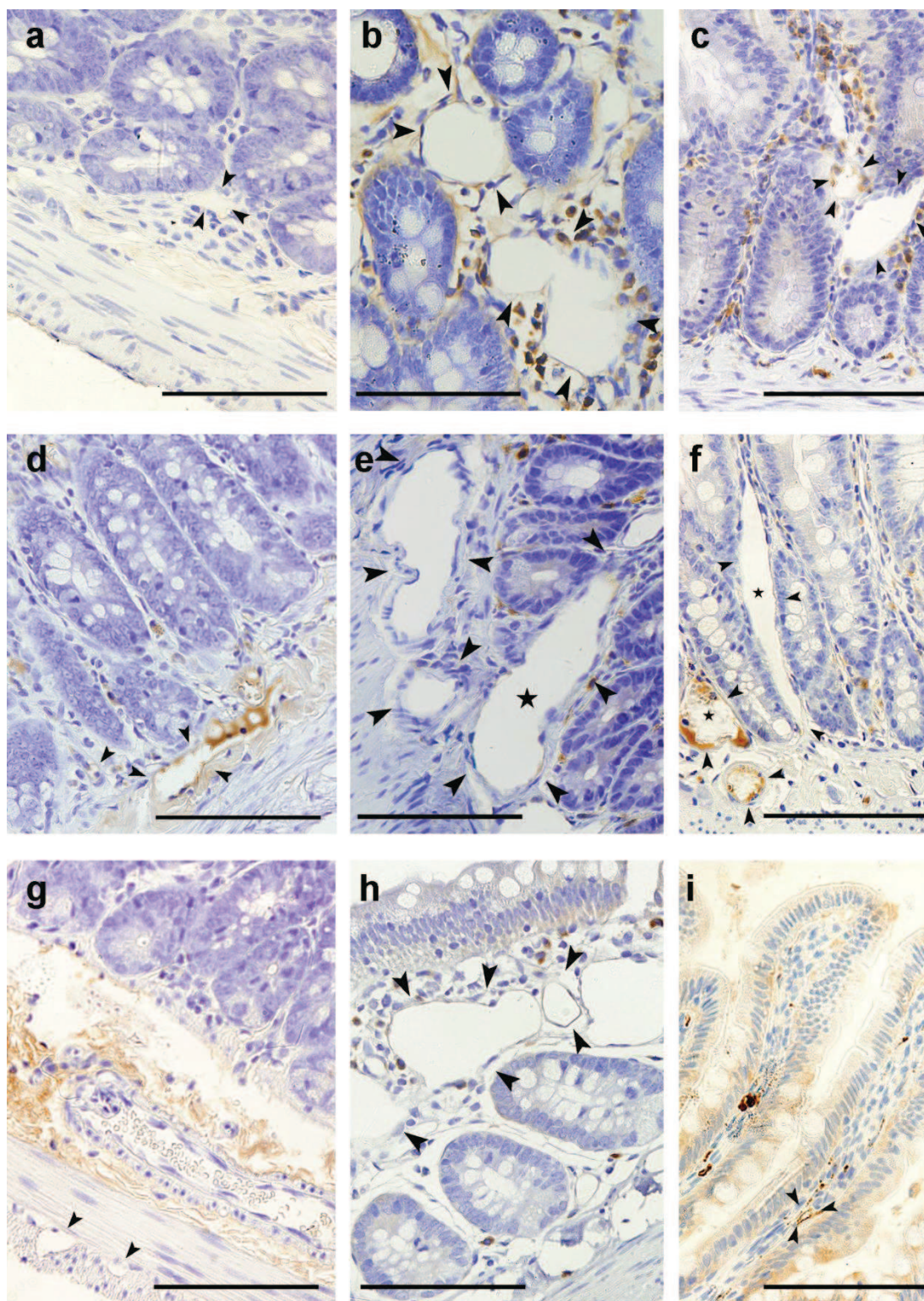


Figura 47. Foto del intestino delgado de ratas pseudo-operadas (PSO), ratas con colestasis microquirúrgica (CM), y ratas con colestasis microquirúrgica que recibieron xenotrasplante de células madre mesenquimales de origen adipocítico (CMX) inmunoteñidas con LYVE1. (a) Imagen del duodeno de una rata PSO: Luz del vaso linfático es observado en la lámina propia (punta de flecha); (b) Lámina propia del duodeno de rata con CM: abundantes y dilatados vasos linfáticos (punta de flecha); (c) Mucosa del duodeno de rata con CMX: el número y tamaño de los microvasos linfáticos es menor comparada con la imagen b, el cual representa a una rata con CM; (d) Imagen del yeyuno de una rata PSO: la luz de un vaso linfático es observado en la submucosa (punta de flecha); (e) Lámina propia del yeyuno de una rata con CM: abundantes y dilatados vasos linfáticos son observados en la lámina propia (estrella) y submucosa (punta de flecha), (f) yeyuno de una rata con CMX: el tamaño y el número de los microvasos linfáticos tanto en mucosa (estrella) y submucosa (punta de flecha) son

evidentes, pero son menores que en la imagen representada es la figura e, el cual representa a una rata con CM; (g) Imagen del íleon de una rata PSO: la luz de dos pequeños vasos linfáticos es observada (punta de flecha); (h) Mucosa del íleon de una rata con CM que muestra una dilatación relevante de los microvasos linfáticos (punta de flecha); (i) Mucosa del íleon de una rata con MCX en el cual el tamaño y número de vasos linfáticos (punta de flecha) esta marcadamente disminuido cuando se compara con la imagen h, el cual representa a una rata con CM. El tamaño de las barras de calibración a través de todas las imágenes es de 100 μm .

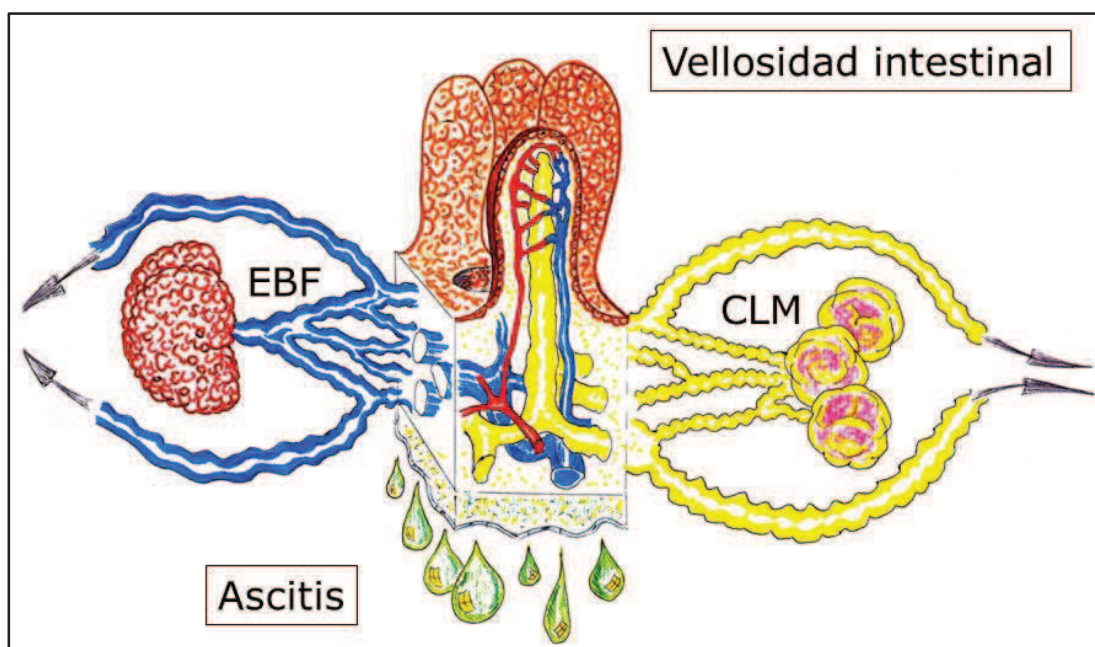


Figura 48. Representación esquemática de las circulaciones esplacnico-sistémica colateral, venosa (izquierda) y linfática (derecha), en ratas con colestasis microquirúrgica (CM). La enfermedad inflamatoria hepática aguda sobre crónica, secundaria a descompensación en ratas con colestasis obstructiva induce enteropatía hipertensiva portal, con respuesta angiogénica y linfangiogénica excesiva, asociado con un incremento de la permeabilidad del endotelio vascular linfático, edema intersticial, incremento de la permeabilidad del mesotelio peritoneal y por último el desarrollo de ascitis. EBF: enfermedad biliar fibrotica; MLC: complejo linfático mesentérico inflamado.

V. DISCUSSION

DISCUSION

En el presente trabajo experimental utilizando métodos estereológicos en combinación con un marcador de superficie celular para células endoteliales fue posible estimar parámetros tales como la fracción de volumen, la densidad de longitud y el diámetro vascular medio de los vasos linfáticos (Lokmic y Mitchell 2011) en el intestino delgado de ratas con colestasis microquirúrgica.

Las células endoteliales linfáticas comparten muchos marcadores en común con las células endoteliales vasculares e incluso con otras células progenitoras hematopoyéticas (Baluk y McDonald 2008). Un marcador celular ideal para ser observado por el microscopio, debe de tener varias características destacables, este debería de ser expresado solo en el tipo celular de interés, debería de estar ausente en otras células y debe tener una buena señal en relación con los tejidos circundantes. Un buen marcador linfático debe ser expresado de forma uniforme en todos los segmentos de los vasos linfáticos durante todas las etapas del desarrollo y enfermedad, en todas las especies estudiadas, y ser resistente a una amplia gama de condiciones de fijación. Aunque pocos marcadores cumplen todas estas condiciones, hay muchos disponibles para el estudio de imágenes microscópicas de los vasos linfáticos y sanguíneos (Baluk y McDonald 2008). La identificación de marcadores de superficie celular que distinguen de forma fiable en endotelio linfático del endotelio vascular sanguíneo ha llevado al desarrollo de técnicas superiores para el aislamiento de células endoteliales linfáticas y vasculares sanguíneas puras. Las células endoteliales linfáticas han sido aisladas mediante selección positiva, utilizando anticuerpos contra la podoplanina, el receptor-3 del factor de crecimiento de endotelio vascular (Vascular endotelial growth factor receptor-3) VEGFR-3 o el receptor de la hialuronidasa de los vasos linfáticos (LYVE)-1 y mediante selección negativa con anticuerpos para el CD34 (Pepper y Skobe 2013). El factor Prox-1 (transcriptional factor prospero-related homeodomain transcription factor) es esencial para el establecimiento de la identidad de células endoteliales linfáticas y su expresión está controlada por el Sox 18 [Hong y Detmar 2003; Schulte-Merker y cols., 2011]. Las células endoteliales linfáticas expresan moléculas específicas tal como el Prox-1, el VEGFR-3, la glucoproteína de membrana podoplanina y el LYVE-1 (Mäkinen y cols., 2007, Alexander y cols., 2010; Alitalo 2011) siendo este último el que hemos utilizado como marcador de células linfáticas para el estudio estereológico presente (figura 47).

El incremento de la fracción del volumen de los vasos linfáticos en la mucosa y submucosa del intestino delgado en este modelo microquirúrgico experimental de fibrosis

biliar podría atribuirse al incremento de la producción intersticial de linfa que a su vez produciría un incremento del flujo y presión en los microvasos linfáticos. Por otra parte la disfunción de los vasos linfáticos intestinales podría resultar en la acumulación progresiva de líquido intersticial rico en lípidos y proteínas y la formación de edema tisular y linfedema (Schulte-Merker y cols., 2011; Alitalo 2011) (figura 48). La estructura de los diferentes compartimentos vasculares linfáticos, como la de los capilares linfáticos y los vasos linfáticos colectores y precolectores, reflejan su doble papel en la absorción de líquido y el transporte de linfa. El endotelio capilar linfático tiene una organización característica de las uniones, así las células endoteliales que tienen forma de hoja de roble están conectadas por uniones que son discontinuas a la manera de botones. Los bordes celulares libres superpuestos anclados a cada lado por estas uniones forman valvas como solapas, a través de las cuales fluye el líquido de forma unidireccional junto al gradiente de presión desde el intersticio hacia la luz del capilar. Por último los capilares linfáticos carecen de células musculares y están conectados a la matriz extracelular a través de filamentos de anclaje, los cuales previenen el colapso de los capilares linfáticos con el aumento de la presión intersticial (Schulte-Merker y cols., 2011).

La colestasis tiene un efecto de deterioro sobre la mucosa intestinal (Gouma y cols., 1986; Quraishy y cols., 1996). En efecto, a corto plazo las ratas colestásicas por ligadura del conducto biliar, sufren de una marcada pérdida de proteínas por las uniones estrechas de la mucosa ileal, con subsecuente incremento de la permeabilidad transepitelial (Porticansa y cols., 2007). En un estudio realizado para evaluar las lesiones hepáticas e intestinales a corto plazo en ratas con colestasis por ligadura del conducto colédoco, se observó una disminución del estado redox intestinal el cual empezó a partir del 7º día de evolución, con una disminución en la concentración del glutatión tanto en la mucosa ileal como en la del colon, también se evidencio una disminución en el contenido de proteínas tanto en el intestino delgado como el grueso. El estudio histológico evidencio en el 3º día de evolución un incremento en el número de linfocitos que había infiltrado el epitelio mucoso además de una fibrosis inicial en la lámina propia, a su vez en el 7º día se evidencio una reducción del grosor del epitelio en el 40% de las ratas y en el 10º día hubo cambios en el 70% de los animales que estaba asociado con edema, y puntos de necrosis en más del 30% de las ratas (Porticansa y cols., 2007). Estos deterioros morfológicos significativos de la mucosa intestinal podrían estar asociados con un incremento de la vulnerabilidad de los vasos linfáticos dentro de las vellosidades intestinales (por su proximidad).

El sistema linfático en las vellosidades del intestino delgado se origina como un gran

vaso o capilar linfático céntrico con un fondo de saco en la porción apical del endotelio. Este capilar linfático está localizado a 50 μm de la mucosa del epitelio. Desde un punto de vista ultraestructural, los capilares linfáticos del intestino delgado son de tipo fenestrado. Aproximadamente la mitad de los espacios interendoteliales están cerrados por un diafragma y en general se sitúan en la base del epitelio de transporte. La frecuencia de estos orificios se incrementa desde el extremo arterial al venoso de los capilares. Estos capilares linfáticos también contienen cavidades que se pueden internalizar como vesículas y fusionarse con otras vesículas intra-endoteliales formando canales trans-endoteliales. El endotelio linfático además está rodeado de una membrana basal fragmentada y posee filamentos de anclaje unidos a la cara abluminal de superposición de las células endoteliales que mantienen el potente lumen linfático. Estos filamentos de anclaje se componen de un continuo de fibras elásticas, para aumentar la elasticidad se extienden desde el linfático inicial hasta los componentes fibrilares de la matriz. Basados en las características ultraestructurales de los linfáticos iniciales, en general se acepta que estos tienen una muy alta conductividad hidráulica y no ofrecen ningún tipo de restricción significativa para el movimiento de solutos y agua (Kvietys y Granger 2010).

La fisiopatología linfática intestinal en las ratas colestásicas podría ser secundario a la inflamación. La redistribución esplácnica de las citoquinas con un incremento en la producción de linfocitos Th1 y Th2 en el intestino delgado y en el complejo mesentérico linfático de las ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica, apoya el rol clave del mecanismo inflamatorio en la fibrosis biliar experimental secundaria (Garcia-Dominguez y cols., 2010). El incremento de los niveles de TNF- α , IL-1 β , IL-4 e IL-10 en el intestino delgado y en el complejo mesentérico linfático atribuido a la respuesta inflamatoria mediada por los mastocitos, sería desencadenado por la hipertensión portal. Los mastocitos tienen la singular capacidad para almacenar TNF- α presintetizados, y pueden liberar de manera espontánea esta citoquina después de que se activan. Se ha planteado la hipótesis de que el TNF- α produce vasodilatación a través de las vías de la PGI₂ y del NO. Si es así, la liberación del TNF- α por los mastocitos activados, puede estar implicado en el desarrollo del estado hiperdinámico esplácnico en este modelo experimental. Además la hiperproducción del TNF- α puede jugar un papel fundamental en el proceso de translocación bacteriana en ratas cirróticas con ascitis, y la administración del anticuerpo monoclonal anti-TNF- α disminuye la incidencia de translocación bacteriana (Garcia-Dominguez y cols., 2010).

La función de drenaje intersticial de los vasos linfáticos mucosos es fundamental para la resolución de la inflamación del intestino delgado. Ahora se piensa que factores

biológicamente activos producidos por el intestino durante la hipertensión portal, sobre todo si esta es secundaria a insuficiencia hepática crónica, y transportada por la linfa mesentérica, contribuirían más que la translocación bacteriana al fallo de órganos a distancia (Deitch 2001; Deitch 2002). En particular en ratas con colestasis extrahepática la evidencia esta ahora emergiendo para apoyar la importancia del intestino y los ganglios linfáticos mesentéricos en la patogénesis del síndrome de disfunción orgánica múltiple (Garcia-Dominguez y cols., 2010). En este sentido, la respuesta inflamatoria de la mucosa intestinal secundaria a hipertensión portal y agravada por el grado de insuficiencia hepática coexistente, causaría linfangiopatía caracterizada por el aclaramiento insuficiente para prevenir la acumulación del exceso de líquido intersticial y mediadores inflamatorios, generando la perpetuación de la inflamación, edema y dilatación de los vasos linfáticos.

El rol de los vasos linfáticos en la producción y evaluación de la inflamación ha sido recientemente cubierta en numerosas revisiones excelentes (Cueni y Detmar 2008; Alexander y cols., 2010; Alitalo 2011; Shin y Lee 2014). El crecimiento de los vasos linfáticos o linfangiogénesis está involucrado activamente en un número de procesos patológicos que incluyen inflamación tisular (Tammela y Alitalo 2010; Kim y cols., 2012). En la edad adulta se sabe que la linfangiogénesis ocurre solo durante ciertas condiciones patológicas como la reparación tisular, inflamación y condiciones relacionadas a tumores. Inicialmente se pensó que la linfangiogénesis se producía solo vía germinación de vasos linfáticos pre-existentes. Pero se ha planteado el debate sobre si la linfangiogénesis depende de manera exclusiva de la proliferación local de células endoteliales linfáticas pre-existentes (linfangiogénesis) o si progenitores endoteliales circulantes pueden contribuir de manera directa (linfovasculogenesis). La trans-diferenciación de macrófagos a células endoteliales linfáticas ha sido descrito en personas con trasplante renal y experimentalmente en modelo de lesión corneal en ratones (Kim y cols., 2012).

En particular la linfangiogénesis podría ser beneficiosa en la amortiguación de la inflamación del tejido asociado con linfedema (Alitalo 2011).

El estudio estereológico realizado en el presente trabajo, sugiere que las alteraciones encontradas en la microcirculación linfática mucosa y submucosa intestinal de las ratas colestásicas, podría ser atribuida a linfangiogénesis secundaria a la respuesta inflamatoria, principalmente mucosa. Sin embargo, se precisarían estudios posteriores para demostrar esta hipótesis. Dos miembros de la familia del VEGF, el VEGF-C y VEGF-D han demostrado que juegan un rol importante en la linfangiogénesis mediante la activación del VEGFR-3, el cual es expresado principalmente en las células endoteliales linfáticas de tejidos adultos normales

(Lee y cols., 1996; Martinez-Corral y cols., 2012). Tanto el VEGF-C y VEGF-D producen linfangiogénesis cuando están sobre-expresados en ratones transgénicos o a través de vectores virales. Es importante destacar que estos factores de crecimiento han sido utilizados de manera terapéutica para formar nuevos vasos linfáticos en modelos de ratón con linfedema primario y secundario, además la hiperplasia linfática inducida por el VEGF-C puede ser persistente y libre de efectos angiogénicos secundarios. El VEGFR-3 es en un inicio expresado de manera amplia en las células endoteliales durante la embriogénesis murina, pero después durante el desarrollo su expresión se restringe en gran medida al endotelio linfático. En tejidos humanos adultos el VEGFR-3 es específico del endotelio linfático, con la excepción de algunos lechos capilares sanguíneos fenestrados y discontinuos. La estimulación del VEGFR-3 protege a las células endoteliales linfáticas de la apoptosis y estimula su proliferación y migración in vitro.

En un modelo de estudio de infección respiratoria crónica por *Mycoplasma pulmonis* en ratas, se observó que la inhibición de la señalización de los factores de crecimiento a través del bloqueo VEGFR-3, inhibe la formación de nuevos vasos linfáticos pero no tuvo ningún efecto sobre la remodelación de los vasos sanguíneos. La inhibición de la linfangiogénesis en este estudio demuestra la predisposición a la producción de linfedema bronquial con reducción de la hipertrofia de ganglios linfáticos de drenaje que es inducida en esta infección (Baluk y cols., 2005).

El incremento de la fracción de volumen y la densidad de longitud de los vasos linfáticos en duodeno e íleon con respecto a la del yeyuno, se podría corresponder con la existencia de un predominio del drenaje linfático a través de ambos extremos del intestino delgado. En este supuesto, la derivación del flujo linfático a través del duodeno e íleon podría asociarse con la instauración de una circulación colateral linfática mesentérico sistémica (figura 48). Este tipo de neo-circulación linfática también podría estar potenciado por la resistencia al flujo linfático intestinal a través del complejo linfático mesentérico que sufren las ratas colestásicas por infiltración inflamatoria. Se ha demostrado que la hipertensión portal prehepática severa en ratas produce adenitis mesentérica, con intensa infiltración por células cebadas (Prieto y cols., 2005; Moquillaza y cols., 2010). En este estudio de la enteropatía hipertensiva portal por ligadura de la vena porta en ratas, se evidencio una infiltración por mastocitos del intestino delgado y del complejo linfático mesentérico. La densidad de mastocitos aumento de forma progresiva a lo largo del intestino delgado. Además la densidad de los mastocitos en el complejo linfático mesentérico fue superior a la encontrada en el intestino delgado (Prieto y cols., 2005). Por esta razón la hipertensión portal

secundario a fibrosis biliar en la rata, causaría una infiltración extensa del complejo linfático mesentérico por mastocitos, que podría bloquear el flujo linfático de origen intestinal e inducir el desarrollo de una circulación colateral linfática mesentérica a través de la vena cava por recirculación pero evitando los ganglios linfáticos mesentéricos infartados (figura 48).

El xenotrasplante de células madre derivadas de adipocitos (ADSC) vía infusión directa en el parénquima hepático de ratas colestásicas de larga evolución, demuestra en el presente trabajo que produce una disminución significativa de la fracción de volumen de los vasos linfáticos intestinales (figura 2c, 2f y 2i). Las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea (BM-MSC), poseen características tal como auto-renovación, proliferación, pluripotencialidad, longevidad y diferenciación, podrían ser una de las fuentes para la terapia mediante el trasplante de células. Sin embargo los procedimientos tradicionales para la obtención de médula ósea puede ser estresante para los pacientes y proporcionar un número bajo de células madre mesenquimales cuando se realiza, por lo que se ha investigado fuentes alternativas de células madre como las ADSCs. En la mayoría de los reportes sobre ADSCs, la fuente del tejido utilizado fue el tejido adiposo abdominal (Lee y cols., 2012). El tejido adiposo es comúnmente obtenido mediante liposucción durante la cirugía plástica, es una fuente atractiva de células madre mesenquimales humanas porque es segura y existe de manera abundante comparado con otros tejidos. Las células madre en el tejido adiposo que son capaces de diferenciarse en células funcionales parecidas a los hepatocitos tienen características fenotípicas similares a las células madre mesenquimales de la médula ósea (BM-MSCs) (Lee y cols., 2012). Las ADSCs del tejido adiposo abdominal mostraron una morfología y función similar a la de los hepatocitos como fuente de glucógeno y secreción de albumina (Seo y cols., 2005; Lee y cols., 2012). Por otra parte, un nivel alto de activina A permite a las ADSCs humanas adquirir el destino de las células de endodermo definitivo, expresando los factores de transcripción específicos HEX, FOXA2, SOX17 y GATA4 de manera sincrónica (Li y cols., 2014).

A partir de entonces, numerosos ensayos han aplicado ADSC en experimentos de fallo hepático agudo (Kim y cols., 2011; Katsuda y cols., 2014; Saido y cols., 2014) deterioro agudo severo (Zhu y cols., 2013) y crónico (Harn y cols., 2012; Koellensperger y cols., 2013; Seki y cols., 2013).

Las ADSCs pueden inhibir las respuestas inflamatorias e inmunes. Estas características especializadas de las ADSCs las ha hecho atractivas para tratar trastornos hepáticos inflamatorios (Seki y cols., 2013). En particular las ADSCs en el fallo hepático crónico murino mostraron una disminución significativa de la actividad inflamatoria y la fibrosis hepática

(Harn y cols., 2012; Seki y cols., 2013). En un modelo de daño hepático crónico en ratas inducido por tioacetamida, el trasplante de ADSCs mediante inoculación hepática directa produce reducción de la expresión de actina del musculo liso- α por las células hepáticas estrelladas así como un incremento en la expresión de la metaloproteinasa-9 de la matriz que degrada las fibras de colágeno (Harn y cols., 2012).

Además la terapia con ADSC ha demostrado ser beneficiosa en un modelo murino de esteatohepatitis no alcohólica (NASH), ya que este puede reparar y mejorar la función de almacenamiento de los hígados con deficiencias (Seki cols., 2013). En un estudio realizado para evaluar la alteración del proceso inflamatorio en hígados con esteatohepatitis no alcohólica mediante la administración de ADSCs, se demostro que el número de células CD11+ que se acumulan en el hígado de roedores cirróticos disminuyen con este tratamiento. Además se aislaron los linfocitos de los hígados de los roedores y se examinó las células T CD4+ y CD8+ mediante citometría de flujo, demostrandose que en los ratones tratados con ADSCs produjo un incremento de células T CD4+ similar al de las células CD8+ (Seki y cols., 2013). El perfil de expresión génica de los hígados en este modelo de NASH de ratón con cirrosis ha mostrado la regulación negativa de genes principalmente relacionados a la inflamación y la respuesta inmune, asociada con regulación positiva de genes relacionados al desarrollo y construcción tisular (Seki y cols., 2013). En este sentido las ADSCs pueden secretar muchos factores de crecimiento tales como VEGF, factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento básico de los fibroblastos, factor de crecimiento transformante- β y factor de crecimiento insulínico tipo 1 (Shi y cols., 2010). De acuerdo con estos resultados, la administración de ADSCs en nuestro modelo experimental de enfermedad hepática crónica, basado en colestasis obstructiva microquirúrgica de larga evolución, también resulto en una reducción significativa del peso hepático y mejora de la función hepática. Estos hallazgos sugieren que el xenotransplante de ADSCs inhibe la respuesta inflamatoria hepática que caracteriza la fibrosis biliar (Aller y cols., 2008a; Sanchez-Patan y cols., 2008b) y consecuentemente mejora la fibrosis hepática y el grado de función hepática. En este caso, la administración de ADSCs al producir la reversibilidad parcial de la hepatopatía podría mejorar la respuesta inflamatoria esplácnica y por lo tanto, inhibir la angiogénesis intestinal secundaria así como la respuesta linfangiogenica.

Los datos con respecto a la aparición de reacciones de defensa inmunológica contra las ADSCs son inconsistentes (Streckbein y cols., 2013). Mientras que los buenos resultados sin rechazo inmunológico significativo han sido descritos en muchos estudios (Arinze y cols., 2003; Ben-David y cols., 2011; Lin y cols., 2012; Tsuji y cols., 2014) otros informaron

respuestas inmunológicas relevantes (Grinnemo y cols., 2004; Poncelet y cols., 2007). Por esta razón, el tacrolimus un inmunosupresor macrolido con un anillo de lactona fue usado para la profilaxis de xenotransplante de ADSCs prediferenciados a hepatocitos. Actúa como un inhibidor de la calcineurina para bloquear la producción de interleucina-2 que conduce a una disminución en la proliferación de células-T (Brazelton y Randall 1996). Hoy en día, los inhibidores de la calcineurina son la base de la mayoría de los protocolos inmunosupresores después del trasplante de órganos y representa la principal terapia inmunosupresora de mantenimiento en el trasplante hepático (Wiesner 1998; Fung 2004; Ganschow y cols., 2014).

Sin embargo se ha descrito que el tacrolimus mejora el potencial invasivo del carcinoma hepatocelular, facilitando la linfangiogénesis y promoviendo la metástasis linfática (Zhou y cols., 2011). Cabe destacar que el VEGF-C esta sobre-expresado en ratas portadoras de tumores de carcinoma hepatocelular tratados con tacrolimus y produce no solo aumento de linfangiogénesis intratumoral sino también de vasos linfáticos peri-tumorales (Zhou y cols., 2011). Estos hallazgos indican que el potencial linfangiogenico del tacrolimus podría ser perjudicial en las ratas colestásicas tratadas con ADSCs ya que podría incrementar las alteraciones microvasculares linfáticas intestinales. En este supuesto, el tratamiento con ADSCs poseería un efecto anti-linfangiogenico ya que nuestros resultados indican la eficacia del ADSCs para aminorar la linfangiopatía intestinal secundaria a insuficiencia hepática crónica en la rata. En este sentido, la inhibición de la linfangiogénesis por ADSCs en ratas colestásicas podría potenciar el linfedema pero sería beneficioso al reducir la respuesta inmune producida en el intestino delgado de las ratas con colestasis microquirúrgica (Alitalo 2011).

La reversibilidad parcial de la ascitis en las ratas con colestasis microquirúrgica de larga evolución tratadas con ADSCs, también podría ser atribuida a la respuesta esplácnica antiinflamatoria mediada por las ADSC (Cho y cols., 2014; Usunier y cols., 2014). Aunque en la actualidad el rol del sistema vascular linfático en la patogenia de la ascitis queda completamente aclarado (Chung y Iwakiri 2013) nosotros hemos propuesto que el intersticio esplácnico, los vasos linfáticos mesentéricos y el mesotelio peritoneal parece crear una vía inflamatoria que podría tener una relevancia fisiopatológica clave en la producción de ascitis (Aller y cols., 2010d).

La demostración en el presente trabajo de la existencia de una enteropatía vascular linfática en las ratas con enfermedad hepática crónica que mejora con el tratamiento con ADSCs permite reforzar la hipótesis inflamatoria en la producción de un eje intersticial-linfático-mesotelio peritoneal. En particular la caracterización del tipo de respuesta

inflamatoria esplácica que desencadena la insuficiencia hepática crónica favorecería un mejor conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos implicados así como la instauración de tratamientos más eficaces para las complicaciones de la cirrosis incluyendo la ascitis.

La presencia de influencias nocivas durante la evolución de la enfermedad hepática crónica implicaría la regresión hacia estados metabólicos más primitivos y la adaptación de un fenotipo isquemia-reperfusión caracterizado por hipoxia, hipometabolismo celular y edema intersticial (Aller y cols., 2007b; Aller y cols., 2010a; Aller y cols., 2007c). El organismo bajo los efectos de este fenotipo reduce sus necesidades metabólicas, incrementa el estrés oxidativo, favorece su hidratación y salinización con retención de agua y sal, mejora la nutrición por difusión con edema celular e intersticial, reduce la producción de energía usando la glucólisis y sufre un proceso de desdiferenciación celular que afecta principalmente a las barreras endotelial y mesotelial favoreciendo la descompartmentalización (Aller y cols., 2010a; Aller y cols., 2007c). Es probable que la magnitud de la hipoxia en los tejidos y órganos no se distribuya de forma uniforme, lo cual a su vez determinaría la heterogenicidad de la respuesta inflamatoria (Aller y cols., 2007a). Estos supuestos mecanismos de defensa son simples pero también menos costosos y facilitan la supervivencia de manera temporal, hasta que un ambiente más favorable hace que sea posible iniciar funciones nutricionales y metabólicas más complejas (Aller y cols., 2007a). Por lo tanto, esto explicaría porque tanto los pacientes como los roedores que sufren una enfermedad hepática crónica e hipertensión portal están predispuestos a desarrollar fallo hepático agudo-sobre-crónico con síndrome hepatorenal (Adebayo y cols., 2015). La disfunción hepatorenal es una característica que define la insuficiencia hepática aguda sobre crónica (ACLF) y ocurre en un 35% de pacientes con ACLF. En este sentido Thabut y cols. encontraron la presencia de SIRS en un 40% de paciente cirróticos con insuficiencia renal funcional (Thabut y cols., 2007). Así mismo la evidencia de que el SIRS tiene un papel importante en la disfunción renal se deriva de estudios que han demostrado que el uso de agentes antiinflamatorios tal como la pentoxifilina mejora la función renal y disminuye significativamente el riesgo de desarrollar fallo renal en pacientes con hepatitis alcohólica (Adebayo y cols., 2015).

Respecto de la ascitis refractaria en pacientes cirróticos (Salerno y cols., 2010) se ha demostrado que en su formación se relacionan dos mecanismos patogénicos como son, la hipertensión portal y la retención de sodio. En particular la ascitis refractaria se refiere a aquella que no puede ser resuelta con restricción de sodio en la dieta y tratamiento diurético. La severidad de esta retención renal de sodio incrementa a través de la historia natural de la cirrosis debido principalmente a la progresión de las alteraciones hemodinámicas portales y

sistémicas así como por la activación de aminas vasoactivas neurohumorales sistémicas que inducen una intensa reabsorción de agua y sodio (Salerno y cols., 2010). Y por último el derrame pleural se produce cuando se asocian influencias nocivas (Aller y cols., 2010d; Aller y cols., 2007a). Básicamente sufrirían un proceso de reperfusión, una complicación aguda y grave en la cual los mastocitos participarían a través de mediadores como la histamina para inducir esta patología aguda sobre crónica en los pacientes y animales que sufren de una enfermedad hepática crónica asociada con hipertensión portal (Aller y cols., 2007a). Por lo tanto nosotros hemos propuesto la hipótesis de que los mastocitos participarían en el empeoramiento de la respuesta inflamatoria sistémica y esplácnica cuando se asocia a la enfermedad hepática crónica (Aller y cols., 2007a; Aller y cols., 2007b). Los mastocitos maduros residen cerca del epitelio y de los vasos sanguíneos del tracto gastrointestinal. En estudios en ratas con triple ligadura de la vena porta se ha visto que los mastocitos sufren de un incremento de manera directa e inmediata. En periodos iniciales la hiperpresión venosa portal es mayor, ya que la circulación colateral porto-sistémica aún no se ha desarrollado y por tanto la isquemia que sufre la mucosa intestinal es consecuencia inmediata de la estasis venosa portal. Por lo tanto la hipertensión venosa asociada con hipoxia podría ser un factor desencadenante importante de la activación de los mastocitos esplácnicos, que liberarían potentes mediadores tanto vasodilatadores como exudativos. Durante la expresión de este fenotipo inflamatorio, en tanto se incrementa y progresa el edema intersticial en el espacio entre las células epiteliales y los capilares, se activa de manera simultánea la circulación linfática. Y por tanto el tejido lesionado sufriría isquemia (hipoxia) (Aller y cols., 2007b; Aller y cols., 2010d).

Los mastocitos son células hematopoyéticas que se originan de precursores pluripotenciales de la médula ósea (Wernersson y Pejler 2014) y por lo tanto representarían un componente importante del propuesto eje inflamatorio de la médula ósea en la enfermedad hepática aguda sobre crónica. Los mastocitos son derivados de la médula ósea, y maduran a partir de progenitores de mastocitos (MCp) en los tejidos periféricos. Durante la hematopoyesis el desarrollo de MCp está altamente regulado por factores de transcripción. En ratones no tratados previamente, los tejidos periféricos como el pulmón contienen muy pocos MCp. El intestino es una excepción ya que contiene una mayor densidad de células con capacidad de mastocitos, incluso mayor que la médula ósea. El elevado número de MCp en el intestino está presente incluso en ratones libres de gérmenes, que han sido expuestos a estímulos antigénicos. Este tipo de células es ampliamente estudiado por la función del receptor c-kit de la tirosina quinasa. El receptor c-kit juega un papel crucial en el desarrollo,

supervivencia y función de los mastocitos a través de la interacción con su ligando el factor de células madre (SCF) (Dahlin y Hallgren 2015). Los ratones con deficiencia de c-kit o de SCF, carecen por completo de mastocitos, lo que demuestra el papel fundamente que tiene cada uno de estos factores en la diferenciación de los mastocitos. Además, la expresión del c-kit sobre los mastocitos completamente maduros de la periferia tiene importancia funcional porque su unión a este (c-kit) resulta en la degranulación de los mastocitos con liberación de mediadores incluyendo dos aminas bioactivas, es decir la histamina y la serotonina (Ray y cols., 2010). En este sentido destaca la activación sistémica de los mastocitos en la enfermedad, que constituyen un desorden primario que está caracterizado por la mayor liberación de mediadores que incluyen: mastocitosis sistémica, síndrome de activación idiopática de los mastocitos sistémicos y leucemia de mastocitos (Molderings 2014). En estas tres clases de activación de los mastocitos en la enfermedad, es frecuente la asociación de hipertensión portal (Lee y cols., 2008) y viceversa, la hipertensión portal cursa con un incremento del número y activación de mastocitos, particularmente en el área esplácnica (Aller y cols., 2007a; Franceschini y cols., 2006; Grizzi y cols., 2013). Los mastocitos están localizados estratégicamente cerca de los vasos sanguíneos y podrían estar entre los primeros en responder al estímulo mecánico que inicia la inflamación esplácnica en la hipertensión portal. Los mediadores liberados por los mastocitos ya que producen edema intersticial, participarían en la producción de la circulación linfática hiperdinámica que podrían tener las ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica.

La estrecha relación entre la hipertensión portal y los mastocitos podría reflejar la existencia de una interacción metabólica compensadora esplácnica. En este supuesto la hipertensión portal al reducir el flujo portal y en consecuencia la función hepatocitaria induciría la estimulación de células cebadas con la consiguiente degranulación de histamina preformada, un modulador intracelular del citocromo P450 en las células hepáticas (LaBella y Brandes 2000) y que por lo tanto participaría en la regulación de los hepatocitos (Brandes y cols., 2002). Las Aminas y el enzima P450 localizadas intracelularmente existían en las formas de vida más primitivas, y por tanto la interacción entre ambas constituye sin duda un aspecto fundamental de la función celular. Una proporción importante, de sitios para actuar de la histamina microsomal está en el citocromo P450, una importante familia de enzimas microsomales que están presentes en las células, pero principalmente en las células hepáticas (LaBella y Brandes 2000). Por otra parte, además de la histamina, las aminas biogenas dopamina, noradrenalina y serotonina se unen a isoenzimas del P450 así como al citocromo C, para modular la función y proliferación de los hepatocitos (Brandes y cols., 2002). Por otro

lado la histamina generada por los mastocitos es capaz de ajustar el equilibrio entre la inmunidad y la tolerancia al afectar a las células dendríticas, es decir, células de kuffer, polarización de células T y producción de citoquinas (Schneider y cols., 2011). Sin embargo estudios filogenéticos indican la aparición de un posible homologo primitivo de mastocitos de vertebrados en un urocordado de 550 millones de años de edad, considerado un ancestro tanto de vertebrados como de cefalocordados (Stevens y Adachi 2007). Estas células primitivas que se parecen a los mastocitos del tejido conectivo son también capaces de liberar histamina (Stevens y Adachi 2007; Da Silva y cols., 2014). A este respecto tanto la producción de heparina como de histamina en los mastocitos evoluciono conjuntamente con la capacidad para almacenar proteasas en los gránulos secretores de los mastocitos de hace 500 millones de años antes de que se desarrollara la inmunidad adquirida (Wong y cols., 2014).

Al recuperar sus funciones metabólicas primitivas, los mastocitos pueden constituir una respuesta metabólica defensiva y adaptativa en la evolución de la enfermedad hepática crónica, y la intensidad de su actividad funcional a través mediadores, con capacidad para modular la capacidad metabólica hepática, este sería inversamente proporcional al grado de insuficiencia hepática. Se explicaría así que existiendo una hipotética correlación entre el aumento de la severidad de la enfermedad hepática y el número y actividad de los mastocitos espláncnicos, un factor que aumente excesivamente la demanda funcional de un hígado insuficiente, induciría una respuesta abrupta o súbita de los mastocitos que si bien podría favorecer el metabolismo hepático, ocasionaría/produciría concomitantemente un excesivo incremento de la permeabilidad endotelial y mesotelial, además de una descompensación aguda de la respuesta inflamatoria crónica propia de la evolución de la enfermedad hepática crónica.

La descompensación de la enfermedad inflamatoria hepática crónica produce una respuesta inflamatoria aguda sobre crónica. Las características evolutivas de ambas patologías estarían condicionadas por las modificaciones metabólicas que impone la propia insuficiencia hepática. En particular la dependencia metabólica de la respuesta inflamatoria aguda sobre crónica, quizá desvirtúa su expresión clínica respecto de las respuestas inflamatorias agudas que se producen en organismos previamente sanos. Por esta razón el paciente con enfermedad hepática crónica cuando sufre un síndrome de respuesta inflamatoria aguda sistémica cursa con sensibilización de las barreras epiteliales, endoteliales y mesoteliales fundamentalmente en el territorio esplácnico y en consecuencia se produce gran edema esplácnico intersticial, excesivo incremento del flujo linfático y por ultimo ascitis. A su vez esta respuesta inflamatoria implicaría la activación de los ejes inflamatorios

sistémicos, neurogenico, y medular óseo los cuales aportarían al espacio intersticial esplácnico, a través de los endotelios vasculares, aquellos mediadores moleculares y celulares necesarios para protagonizar la respuesta inflamatoria. En este proceso los órganos y tejidos inflamados sufren un cambio metabólico abrupto, caracterizado por hipoxia, hipometabolismo, acidosis metabólica y desdiferenciación. A su vez el gran incremento de la permeabilidad de las barreras epiteliales, endotelial y mesotelial esplácnicas seria secundario a esta hipotética regresión metabólica que favorecería tanto el edema celular, como intersticial y cavitario.

Los mastocitos se encuentran en un número elevado en el territorio esplácnico, asociados a la hipertensión portal y la insuficiencia hepática crónica experimental, lo que sugiere que desempeñan un importante papel etiopatogenico. Aunque su función más destacada es la participación en la inmunidad natural y adquirida, en la hipertensión portal con insuficiencia hepática crónica asociada, los mastocitos podrían ejercer una actividad metabólica, mediada en particular por aminas biogenas, tal como histamina y serotonina, que modularía la actividad de enzimas microsomales tanto en el parénquima hepático lesionado como en otros órganos y tejidos esplácnicos donde estas enzimas abundan. El aprovechamiento de esta actividad metabólica inductora de funciones propias del parénquima hepático por los mediadores liberados por las células cebadas, desechando los efectos secundarios nocivos asociados representaría un futuro terapéutico esperanzador para una patología con elevada morbi-mortalidad en la actualidad.

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Las ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica crónica presentan linfangiopatía intestinal, caracterizada por un incremento de la fracción de volumen y densidad de longitud de los capilares linfáticos mucosos y submucosos.
2. La linfangiopatía intestinal en la ictericia obstructiva crónica experimental se agrava dependiendo de su localización en el intestino delgado, siendo más intensa en duodeno e íleon.
3. El xenotrasplante con células madre mesenquimales prediferencias a hepatocitos en ratas con colestasis extrahepática revierte parcialmente tanto la insuficiencia hepática crónica como la linfangiopatía intestinal.

VII. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Abdeldayem H, Ghoneim E, Refaei AA, Abou-Gabal A. Obstructive jaundice promotes intestinal-barrier dysfunction and bacterial translocation: experimental study. *Hepatology*. 2007; 1:444-8.
- Abdel-khalek EE, El-Fakhry A, Helaly M, Hamed M, Elbaz O. Systemic inflammatory response syndrome in patients with liver cirrhosis. *Araba J Gastroenterol*. 2011; 12:173-7.
- Abu-Amara M, Yang SY, Tapuria N, Fuller B, Davidson B, Seifalian A. Liver ischemia/reperfusion injury: processes in inflammatory networks--a review. *Liver Transpl*. 2010; 16:1016-32.
- Abraham SC, Poterucha JJ, Rosen CB, Demetris AJ, Krasinskas AM. Histologic abnormalities are common in protocol liver allograft biopsies from patients with normal liver function tests. *Am J Surg Pathol*. 2008; 32:965-73.
- Abraldes JG, García-Pagán JC. Animal models for the study of portal hypertension. *Gastroenterol Hepatol*. 2006; 29:51-9.
- Adair-Kirk TL, Senior RM. Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008; 40:1101-10.
- Adebayo D, Morabito V, Davenport A, Jalan R. Renal dysfunction in cirrhosis is not just a vasomotor nephropathy. *Kidney Int*. 2015; 87:509-15.
- Akimoto T, Hayashi N, Adachi M, Kobayashi N, Zhang XJ, Ohsuga M, Katsuta Y. Viability and plasma vitamin K levels in the common bile duct-ligated rats. *Exp Anim*. 2005; 54:155-61.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Cell –cell adhesion and the extracellular matrix. En: *Molecular biology of the cell*. Edit. Garland Publishing, Inc. New York. Chapter 12; 1983; pp.673-715.
- Albrecht M, Frungieri MB, Kunz L, Rämisch R, Meineke V, Köhn FM, Mayerhofer A. Divergent effects of the major mast cell products histamine, tryptase and TNF-alpha on human fibroblast behaviour. *Cell Mol Life Sci*. 2005; 62:2867-76.
- Alexander JS, Ganta VC, Jordan PA, Witte MH. Gastrointestinal lymphatics in health and disease. *Pathophysiology*. 2010; 17:315-335.
- Alitalo K. The lymphatic vasculature in disease. *Nat Med*. 2011; 17:1371-1380.
- Allen K, Jaeschke H, Copple BL. Bile acids induce inflammatory genes in hepatocytes: a novel mechanism of inflammation during obstructive cholestasis. *Am J Pathol*.

2011; 178:175-86.

- Aller MA, Lorente L, Alonso S, Arias J. A model of cholestasis in the rat, using a microsurgical technique. *Scand J Gastroenterol*. 1993; 28:10-4.
- Aller MA, Duran M, Ortega L, Arias JL, Nava MP, Prieto I, Arias J. Comparative study of macro- and microsurgical extrahepatic cholestasis in the rat. *Microsurgery*. 2004a; 24:442-7.
- Aller MA, Nava MP, Arias JL, Durán M, Prieto I, Llamas MA, Arias J. Microsurgical extrahepatic cholestasis in the rat: a long-term study. *J Invest Surg*. 2004b; 17:99-104.
- Aller MA, Vara E, García C, Nava MP, Angulo A, Sánchez-Patán F, Calderón A, Vergara P, Arias J. Hepatic lipid metabolism changes in short- and long-term prehepatic portal hypertensive rats. *World J Gastroenterol*. 2006; 12:6828-34.
- Aller MA, Nava MP, Cuellar C, Chivato T, Arias JL, Sanchez-Patan F, de Vicente F, Alvarez E, Arias J. Evolutive phases of experimental prehepatic portal hypertension. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007a; 22:1127-33.
- Aller MA, Arias JL, Cruz A, Arias J. Inflammation: a way to understanding the evolution of portal hypertension. *Theor Biol Med Model*. 2007b; 4:44.
- Aller MA, Arias JL, Arias J. The mast cell integrates the splanchnic and systemic inflammatory response in portal hypertension. *J Transl Med*. 2007c; 5:44.
- Aller MA, Arias JL, García-Domínguez J, Arias JI, Durán M, Arias J. Experimental obstructive cholestasis: the wound-like inflammatory liver response. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2008a; 1:6.
- Aller MA, Vara E, García C, Méndez M, Méndez-López M, Mejía I, López L, Arias JL, Arias J. Prehepatic portal hypertension worsens the enterohepatic redox balance in thioacetamide-cirrhotic rats. *Pathophysiology*. 2008b; 15:233-42.
- Aller MA, Nava MP. Anesthesia, Analgesia and Postoperative Care. En: *Microsurgery in Liver Research*, Aller MA, Arias J. Eds. Bentham Scientific Publishers, 2009: 49-70.
- Aller MA, Nava MP, Méndez M, Vergara P, Arias JL. Laboratory Rat Management. En: *Microsurgery In Liver Research*, Aller MA; Arias J. Eds. Bentham Scientific Publishers. 2009a; pp.7-31.
- Aller MA, Prieto I, Cruz A, Losada M, Arias JI , García-Domínguez J, Argudo S, Arias JL, Arias J. Extrahepatic Cholestasis En: *Microsurgery In Liver Research*, Aller mA; Arias J. Eds Bentham Scientific Publishers. 2009b; pp. 137-156
- Aller MA, García-Domínguez J, Vergara P, Arias J. Mast cells in wound-healing cholestatic liver response. *Burns*. 2010a; 36:292-4.

- Aller MA, Arias JL, Prieto I, Losada M, Arias J. Bile duct ligation: step-by-step to cholangiocyte inflammatory tumorigenesis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2010b; 22:651-61.
- Aller MA, Arias JL, Arias J. Pathological axes of wound repair: gastrulation revisited. *Theor Biol Med Model*. 2010c; 7:37.
- Aller MA, Prieto I, Argudo S, de Vicente F, Santamaría L, de Miguel MP, Arias JL, Arias J. The interstitial lymphatic peritoneal mesothelium axis in portal hypertensive ascites: when in danger, go back to the sea. *Int J Inflamm*. 2010d; 2010:148689.
- Alvaro D, Mancino MG, Onori P, Franchitto A, Alpini G, Francis H, Glaser S, Gaudio E. Estrogens and the pathophysiology of the biliary tree. *World J Gastroenterol*. 2006; 12:3537-45.
- Alvaro D, Macarri G, Mancino MG, Marzioni M, Bragazzi M, Onori P, Corradini SG, Invernizzi P, Franchitto A, Attili AF, Gaudio E, Benedetti A. Serum and biliary insulin-like growth factor I and vascular endothelial growth factor in determining the cause of obstructive cholestasis. *Ann Intern Med*. 2007; 147:451-9.
- Arduini A, Serviddio G, Escobar J, Tormos AM, Bellanti F, Viña J, Monsalve M, Sastre J. Mitochondrial biogenesis fails in secondary biliary cirrhosis in rats leading to mitochondrial DNA depletion and deletions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011; 301:G119-27.
- Arias JL, Aller MA, Arias J. The use of inflammation by tumor cells. *Cancer* 2005; 104:223-8.
- Arias JL, Aller MA, Sánchez-Patan F, Arias J. Inflammation and cancer: is trophism the link? *Surg Oncol*. 2006; 15:235-42.
- Arias JL, Aller MA, Arias J. Cancer cell: using inflammation to invade the host. *Mol Cancer*. 2007; 6:29.
- Arinzech TL, Peter SJ, Archambault MB, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-size canine segment defect. *J Bone Joint Surg Am*. 2003; 85-A:1927-1935.
- Armbrust T, Batusic D, Ringe B, Ramadori G. Mast cells distribution in human liver disease and experimental rat liver fibrosis. Indications for mast cell participation in development of liver fibrosis. *J Hepatol*. 1997; 26:1042-54.
- Artuc M, Hermes B, Steckelings UM, Grützkau A, Henz BM. Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing--active participants or innocent bystanders? *Exp Dermatol*. 1999; 8:1-16.

- Assimakopoulos SF, Vagianos CE, Zervoudakis G, Filos KS, Georgiou C, Nikolopoulou V, Scopa CD. Gut regulatory peptides bombesin and neurotensin reduce hepatic oxidative stress and histological alterations in bile duct ligated rats. *Regul Pept.* 2004; 120:185-93.
- Assimakopoulos SF, Maroulis I, Patsoukis N, Vagenas K, Scopa CD, Georgiou CD, Vagianos CE. Effect of antioxidant treatments on the gut-liver axis oxidative status and function in bile duct-ligated rats. *World J Surg.* 2007; 31:2023-32.
- Assimakopoulos SF, Vagianos CE. Bile duct ligation in rats: a reliable model of hepatorenal syndrome? *World J Gastroenterol.* 2009; 15:121-3.
- Au SR, Au K, Saggars GC, Karne N, Ehrlich HP. Rat mast cells communicate with fibroblasts via gap junction intercellular communications. *J Cell Biochem.* 2007; 100:1170-7.
- Aubé C, Moal F, Oberti F, Roux J, Croquet V, Gallois Y, Argaud C, Caron C, Calès P. Diagnosis and measurement of liver fibrosis by MRI in bile duct ligated rats. *Dig Dis Sci.* 2007; 52:2601-9.
- Azmaiparashvili E, Kordzaia D, Dzidziguri D. Biliary hypertension as the cell proliferation trigger in bile duct ligated rats. *Georgian Med News.* 2009; (168):111-6.
- Azouz A, Razzaque MS, El-Hallak M, Taguchi T. Immunoinflammatory responses and fibrogenesis. *Med Electron Microsc.* 2004; 37:141-8.
- Bachelet I, Levi-Schaffer F, Mekori YA. Mast cells: not only in allergy. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2006; 26:407-25.
- Baddeley A, Dorph-Petersen KA, Vedel Jensen EB. A note on the stereological implications of irregular spacing of sections. *J Microsc.* 2006; 222:177-81.
- Baluk P, Tammela T, Ator E, Lyubynska N, Achen MG, Hicklin DJ, Jeltsch M, Petrova TV, Pytowski B, Stacker SA, Ylä-Herttuala S, Jackson DG, Alitalo K, McDonald DM. Pathogenesis of persistent lymphatic vessel hyperplasia in chronic airway inflammation. *J Clin Invest.* 2005; 115:247-57.
- Baluk P, McDonald DM. Marker for microscopic imaging of lymphangiogenesis and angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1131:1-12.
- Balzan S, de Almeida Quadros C, de Cleva R, Zilberstein B, Cecconello I. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007; 22:464-71.
- Bangaru B, Morecki R, Glaser JH, Gartner LM, Horwitz MS. Comparative studies of biliary atresia in the human newborn and reovirus-induced cholangitis in weanling

- mice. *Lab Invest.* 1980; 43:456-62.
- Barón V, Hernández J, Noyola M, Escalante B, Muriel P. Nitric oxide and inducible nitric oxide synthase expression are downregulated in acute cholestasis in the rat accompanied by liver ischemia. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2000; 127:243-9.
 - Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res* 2001; 268:189-200.
 - Bartlett AH, Hayashida K, Park PW. Molecular and cellular mechanisms of syndecans in tissue injury and inflammation. *Mol Cells.* 2007; 24:153-66.
 - Batailler R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest.* 2005; 115:209-18.
 - Beck PL, Lee SS. Vitamin K1 improves survival in bile-duct-ligated rats with cirrhosis. *J Hepatol.* 1995; 23:235.
 - Bellot P, Frances R, Such J. Pathological bacterial translocation in cirrhosis: pathophysiology, diagnosis and clinical implications. *Liver Int.* 2013; 33:31-9.
 - Ben-David D, Kizhner TA, Kohler T, Muller R, Livne E, Srouji S. Cell-scaffold transplant of hydrogel seeded with rat bone marrow progenitors for bone regeneration. *J Craniomaxillofac Surg.* 2011; 39:364-371.
 - Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun.* 1979; 23:403-11
 - Bergheim I, Harsch S, Mueller O, Schimmel S, Fritz P, Stange EF. Apical sodium bile acid transporter and ileal lipid binding protein in gallstone carriers. *J Lipid Res.* 2006; 47:42-50.
 - Bergheim I, Guo L, Davis MA, Dubeau I, Arteel GE. Critical role of plasminogen activator inhibitor-1 in cholestatic liver injury and fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006; 316:592-600.
 - Bischofs IB, Schwarz US. Cell organization in soft media due to active mechanosensing. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100:9274-9.
 - Bissell DM. Assessing fibrosis without a liver biopsy: are we there yet? *Gastroenterology.* 2004; 127:1847-9.
 - Black DM, Behrns KE. A scientist revisits the atrophy-hypertrophy complex: hepatic apoptosis and regeneration. *Surg Oncol Clin N Am.* 2002; 11:849-64.
 - Bogert PT, LaRusso NF. Cholangiocyte biology. *Curr Opin Gastroenterol.* 2007; 23:299-

305.

- Bogorad RL, Ostroukhova TY, Orlova AN, Rubtsov PM, Smirnova OV. Long isoform of prolactin receptor predominates in rat intrahepatic bile ducts and further increases under obstructive cholestasis. *J Endocrinol.* 2006; 188:345-54.
- Bomzon A, Gali D, Better OS, Blendis LM. Reversible suppression of the vascular contractile response in rats with obstructive jaundice. *J Lab Clin Med.* 1985; 105:568-72.
- Brandes LJ, Queen GM, LaBella FS. Displacement of histamine from liver cells and cell components by ligands for cytochromes P450. *J Cell Biochem* 2002; 85:820-824.
- Brazelton TR, Randal ME. Molecular mechanisms of action of new xenobiotic immunosuppressive drugs: tacrolimus (FK506), sirolimus (rapamycin), mycophenolate mofetil and leflunomide. *Curr Opin Immunol.* 1996; 8:710-720.
- Campbell KM, Sabla GE, Bezerra JA. Transcriptional reprogramming in murine liver defines the physiologic consequences of biliary obstruction. *J Hepatol.* 2004; 40:14-23.
- Canbay A, Higuchi H, Bronk SF, Tanai M, Sebo TJ, Gores GJ. Fas enhances fibrogenesis in the bile duct ligated mouse: a link between apoptosis and fibrosis. *Gastroenterology.* 2002; 123:1323-30.
- Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology.* 2004; 39:273-8.
- Cantor JO, Nadkarni PP. Hyaluronan: the Jekyll and Hyde molecule. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2006; 5:257-60.
- Cassiman D, Libbrecht L, Desmet V, Denef C, Roskams T. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *J Hepatol.* 2002a; 36:200-9.
- Cassiman D, Roskams T. Beauty is in the eye of the beholder: emerging concepts and pitfalls in hepatic stellate cell research. *J Hepatol.* 2002b; 37:527-35.
- Caughey GH. Mast cell proteases as protective and inflammatory mediators. *Adv Exp Med Biol.* 2011; 716:212-34.
- Cazzaniga M, Dionigi E, Gobbo G, Fioretti A, Monti V, Salerno F. The systemic inflammatory response syndrome in cirrhotic patients: Relationship with their in-hospital outcome. *J Hepatol.* 2009; 51:475-82.
- Chagraoui J, Lepage-Noll A, Anjo A, Uzan G, Charbord P. Fetal liver stroma consists of cells in epithelial-to-mesenchymal transition. *Blood.* 2003; 101:2973-82.

- Chan CC, Wang SS, Lee FY, Chang FY, Lin HC, Hou MC, Huang HC, Lee SD. Effects of endothelin-1 on portal-systemic collaterals of common bile duct-ligated cirrhotic rats. *Eur J Clin Invest.* 2004; 34:290-6.
- Chen B, Fu B. A model for charged molecule transport in the interstitial space. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2005; 1:55-8.
- Cheng CW, Duwaerts CC, Rooijen Nv, Wintermeyer P, Mott S, Gregory SH. NK cells suppress experimental cholestatic liver injury by an interleukin-6-mediated, Kupffer cell-dependent mechanism. *J Hepatol.* 2011; 54:746-52.
- Cho KS, Park MK, Kang SA. Adipose-derived stem cells ameliorate allergic airway inflammation by inducing regulatory T cells in a mouse model of asthma. *Mediators Inflamm.* 2014; 436476:2014.
- Chung C, Iwakiri Y. The lymphatic vascular system in liver diseases: its role in ascites formation. *Clin Mol Hepatology.* 2013; 19:99-104.
- Chuang YH, Lan RY, Gershwin ME. The immunopathology of human biliary cell epithelium. *Semin Immunopathol.* 2009; 31:323-31.
- Clements WD, Parks R, Erwin P, Halliday MI, Barr J, Rowlands BJ. Role of the gut in the pathophysiology of extrahepatic biliary obstruction. *Gut.* 1996a; 39:587-93.
- Clements WD, McCaigue M, Erwin P, Halliday I, Rowlands BJ. Biliary decompression promotes Kupffer cell recovery in obstructive jaundice. *Gut.* 1996b; 38:925-31.
- Clements WD, Erwin P, McCaigue MD, Halliday I, Barclay GR, Rowlands BJ. Conclusive evidence of endotoxaemia in biliary obstruction. *Gut.* 1998; 42:293-9.
- Corradi F, Brusasco C, Fernández J, Vila J, Ramirez MJ, Seva-Pereira T, Fernández-Varo G, Mosbah IB, Acevedo J, Silva A, Rocco PR, Pelosi P, Gines P, Navasa M. Effects of pentoxifylline on intestinal bacterial overgrowth, bacterial translocation and spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic rats with ascites. *Dig Liver Dis.* 2012; 44:239-44.
- Costa AM, Tuchweber B, Lamireau T, Yousef IM, Balabaud C, Rosenbaum J, Desmoulière A. Role of apoptosis in the remodeling of cholestatic liver injury following release of the mechanical stress. *Virchows Arch.* 2003; 442:372-80.
- Cruz-Orive LM. Particle number can be estimated using a disector of unknown thickness: the selector. *J Microsc.* 1987; 145:121-42.
- Cuenca J, Martín-Sanz P, Alvarez-Barrientos AM, Boscá L, Goren N. Infiltration of inflammatory cells plays an important role in matrix metalloproteinase expression and activation in the heart during sepsis. *Am J Pathol.* 2006; 169:1567-76.

- Cueni LN, Detmar M. The lymphatic system in health and disease. *Lymphat Res Biol.* 2008; 6:109-122.
- Da Silva EZ, Jamur MC, Oliver C. Mast cell function: a new vision of an old cell. *J Histochem Cytochem* 2014; 62:698-738.
- Dahlin JS, Hallgren J. Mast cell progenitors: origin, development and migration to tissues. *Mol Immunol* 2015; 63:9-17.
- Davis GE. Angiogenesis and Proteinases: Influence on Vascular Morphogenesis, Stabilization and Regression. *Drug Discov Today Dis Models.* 2011; 8:13-20.
- Day AJ, de la Motte CA. Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation? *Trends Immunol.* 2005; 26:637-43.
- Deitch EA. Bacterial translocation of the gut flora. *J Trauma.* 1990; 30:S184-9.
- Deitch EA. Role of the gut lymphatic system in multiple organ failure. *Curr Opin Crit Care.* 2001; 7:92-98.
- Deitch EA. Bacterial translocation or lymphatic drainage of toxic products from the gut: what is important in human beings? *Surgery.* 2002; 131:241-244.
- Desmoulière A, Darby I, Costa AM, Raccurt M, Tuchweber B, Sommer P, Gabbiani G. Extracellular matrix deposition, lysyl oxidase expression, and myofibroblastic differentiation during the initial stages of cholestatic fibrosis in the rat. *Lab Invest.* 1997; 76:765-78.
- Diez-Arias JA, Aller MA, Palma MD, Arias JL, Muñiz E, Sánchez M, Arias J. Increased duodenal mucosa infiltration by mast cells in rats with portal hypertension. *Dig Surg.* 2001; 18:34-40.
- Ding WX, Yin XM. Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury. *J Cell Mol Med.* 2004; 8:445-54.
- Dold S, Laschke MW, Zhau Y, Schilling M, Menger MD, Jeppsson B, Thorlacius H. P-selectin glycoprotein ligand-1-mediated leukocyte recruitment regulates hepatocellular damage in acute obstructive cholestasis in mice. *Inflamm Res.* 2010; 59:291-8.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8:315-7.
- Donner MG, Schumacher S, Warskulat U, Heinemann J, Häussinger D. Obstructive cholestasis induces TNF-alpha- and IL-1 -mediated periportal downregulation of Bsep

- and zonal regulation of Ntcp, Oatp1a4, and Oatp1b2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007; 293:G1134-46.
- Eslimi D, Oryan S, Nasehi M, Zarrindast MR. Effects of opioidergic systems upon anxiolytic-like behaviors induced in cholestatic rats. *Eur J Pharmacol.* 2011; 670:180-5.
 - Evanko SP, Tammi MI, Tammi RH, Wight TN. Hyaluronan-dependent pericellular matrix. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007; 59:1351-65.
 - Fallere DJ, Hines JE, Walls AF, Kelly PJ, Bennett MK, Burt AD. Intrahepatic mast cells in chronic liver diseases. *Hepatology* 1995; 22: 1175-81.
 - Farrell DJ, Hines JE, Walls AF, Kelly PJ, Bennett MK, Burt AD. Intrahepatic mast cells in chronic liver diseases. *Hepatology.* 1995; 22:1175-81.
 - Fernández-Martínez E, Pérez-Alvarez V, Tsutsumi V, Shibayama M, Muriel P. Chronic bile duct obstruction induces changes in plasma and hepatic levels of cytokines and nitric oxide in the rat. *Exp Toxicol Pathol* 2006; 58:49-58.
 - Fragiadaki M, Mason RM. Epithelial-mesenchymal transition in renal fibrosis - evidence for and against. *Int J Exp Pathol.* 2011; 92:143-50.
 - Francés R, Chiva M, Sánchez E, González-Navajas JM, Llovet T, Zapater P, Soriano G, Muñoz C, Balanzó J, Pérez-Mateo M, Song XY, Guarner C, Such J. Bacterial translocation is downregulated by anti-TNF-alpha monoclonal antibody administration in rats with cirrhosis and ascites. *J Hepatol.* 2007; 46:797-803.
 - Franceschini B, Ceva-Grimaldi G, Russo C, Dioguardi N, Grizzi F. The complex functions of mast cells in chronic human liver diseases. *Dig Dis Sci* 2006; 51:2248-56.
 - Friedman SL. Hepatic fibrosis - overview. *Toxicology.* 2008; 254:120-9.
 - Fung JJ. Tacrolimus and transplantation: a decade in review. *Transplantation.* 2004; 77:S41-43
 - Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2005a; 6:135-42.
 - Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimaldeston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol.* 2005b; 23:749-86.
 - Ganschow R, Pollok JM, Jankofsky M, Junge G. The role of everolimus in liver transplantation. *Clin Exp Gastroenterology.* 2014; 7:329-343.
 - García-Domínguez J, Aller MA, García C, de Vicente F, Corcuera MT, Gómez-Aguado F, Alonso MJ, Vara E, Arias J. Splanchnic Th(2) and Th(1) cytokine redistribution in

- microsurgical cholestatic rats. *J Surg Res.* 2010; 162:203-12.
- García-Moreno LM, Angeles Aller M, Conejo NM, Gómez MA, Martin FR, Arias J, Arias JL. Brain Ag-NOR activity in cholestatic rats with hepatic encephalopathy. *Hepatol Res.* 2002; 24:275.
 - Garcia-Tsao G, Wiest R. Gut microflora in the pathogenesis of the complications of cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2004; 18:353-72.
 - Gartung C, Ananthanarayanan M, Rahman MA, Schuele S, Nundy S, Soroka CJ, Stolz A, Suchy FJ, Boyer JL. Down-regulation of expression and function of the rat liver Na⁺/bile acid cotransporter in extrahepatic cholestasis. *Gastroenterology.* 1996; 110:199-209.
 - Gaudio E, Onori P, Pannarale L, Alvaro D. Hepatic microcirculation and peribiliary plexus in experimental biliary cirrhosis: a morphological study. *Gastroenterology.* 1996; 111:1118-24.
 - Gaudio E, Barbaro B, Alvaro D, Glaser S, Francis H, Franchitto A, Onori P, Ueno Y, Marzioni M, Fava G, Venter J, Reichenbach R, Summers R, Alpini G. Administration of r-VEGF-A prevents hepatic artery ligation-induced bile duct damage in bile duct ligated rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006; 291:G307-17.
 - Geerts AM, Vanheule E, Praet M, Van Vlierberghe H, De Vos M, Colle I. Comparison of three research models of portal hypertension in mice: macroscopic, histological and portal pressure evaluation. *Int J Exp Pathol.* 2008; 89:251-63.
 - Gehring S, Dickson EM, San Martin ME, van Rooijen N, Papa EF, Harty MW, Tracy TF Jr, Gregory SH. Kupffer cells abrogate cholestatic liver injury in mice. *Gastroenterology.* 2006; 130:810-22.
 - Geier A, Dietrich CG, Voigt S, Kim SK, Gerloff T, Kullak-Ublick GA, Lorenzen J, Matern S, Gartung C. Effects of proinflammatory cytokines on rat organic anion transporters during toxic liver injury and cholestasis. *Hepatology.* 2003; 38:345-54.
 - Georges PC, Hui JJ, Gombos Z, McCormick ME, Wang AY, Uemura M, Mick R, Janmey PA, Furth EE, Wells RG. Increased stiffness of the rat liver precedes matrix deposition: implications for fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007; 293:G1147-54.
 - Georgiev P, Jochum W, Heinrich S, Jang JH, Nocito A, Dahm F, Clavien PA. Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. *Br J Surg.* 2008; 95:646-56.
 - Geudens I, Gerhardt H. Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. *Development.* 2011; 138:4569-83.

- Ghavami S, Hashemi M, Kadkhoda K, Alavian SM, Bay GH, Los M. Apoptosis in liver diseases--detection and therapeutic applications. *Med Sci Monit.* 2005; 11:RA337-45.
- Glaser SS, Gaudio E, Miller T, Alvaro D, Alpini G. Cholangiocyte proliferation and liver fibrosis. *Expert Rev Mol Med.* 2009; 11:e7.
- Glaser S, Gaudio E, Renzi A, Mancinelli R, Ueno Y, Venter J, White M, Kopriva S, Chiasson V, DeMorrow S, Francis H, Meng F, Marzioni M, Franchitto A, Alvaro D, Supowit S, DiPette DJ, Onori P, Alpini G. Knockout of the neurokinin-1 receptor reduces cholangiocyte proliferation in bile duct-ligated mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011; 301:297-305.
- Gordon JR, Galli SJ. Promotion of mouse fibroblast collagen gene expression by mast cells stimulated via the Fc epsilon RI. Role for mast cell-derived transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 1994; 180:2027-37.
- Gossard AA. Care of the cholestatic patient. *Clin Liver Dis.* 2013; 17:331-44.
- Gouma DJ, Coelho JC, Fisher JD, Schlegel JF, Li YF, Moody FG. Endotoxemia after relief of biliary obstruction by internal and external drainage in rats. *Am J Surg.* 1986; 151:476-479.
- Green J, Better OS. Systemic hypotension and renal failure in obstructive jaundice--mechanistic and therapeutic aspects. *J Am Soc Nephrol.* 1995; 5:1853-71.
- Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options. *Comp Hepatol.* 2007; 6:7.
- Grinnemo KH, Mansson A, Dellgren G, et al. Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004; 127:1293-1300.
- Grizzi F, Di Caro G, Laghi L, Hermonat P, Mazzola P, Nguyen DD, Radhi S, Figueroa JA, Cobos E, Annoni G, Chiriva-Internati M. Mast cells and the liver aging process. *Immun Ageing* 2013; 10:9.
- Gruber BL. Mast cells in the pathogenesis of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep* 2003; 5:147-53.
- Guilak F, Lott KE, Awad HA, Cao Q, Hicok KC, Fermor B, Gimble JM. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *J Cell Physiol* 2006; 206:229-37.
- Gujral JS, Farhood A, Bajt ML, Jaeschke H. Neutrophils aggravate acute liver injury during obstructive cholestasis in bile duct-ligated mice. *Hepatology.* 2003; 38:355-63.

- Gundersen HJ. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. *J Microsc.* 1986; 143:3-45.
- Gurish MF, Boyce JA. Mast cells: ontogeny, homing and recruitment of a unique innate effector cell. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 117:1285-91.
- Hajrasouliha AR, Tavakoli S, Jabehdar-Maralani P, Shafaroodi H, Borhani AA, Houshmand G, Sadeghipour H, Dehghani M, Dehpour AR. Resistance of cholestatic rats against epinephrine-induced arrhythmia: the role of nitric oxide and endogenous opioids. *Eur J Pharmacol.* 2004; 499:307-13.
- Hallgren J, Gurish MF. Pathways of murine mast cell development and trafficking: tracking the roots and routes of the mast cell. *Immunol Rev.* 2007; 217:8-18.
- Harn HJ, Lin SZ, Hung SH, Subeq YM, Li YS, Syu WS, Ding DC, Lee RP, Hsieh DK, Lin PC, Chiou TW. Adipose-derived stem cells can abrogate chemical-induced liver fibrosis and facilitate recovery of liver function. *Cell Transplant.* 2012; 21:2753-2764.
- Harry D, Anand R, Holt S, Davies S, Marley R, Fernando B, Goodier D, Moore K. Increased sensitivity to endotoxemia in the bile duct-ligated cirrhotic rat. *Hepatology* 1999; 30:1198-205.
- Harty MW, Huddleston HM, Papa EF, Puthawala T, Tracy AP, Ramm GA, Gehring S, Gregory SH, Tracy TF Jr. Repair after cholestatic liver injury correlates with neutrophil infiltration and matrix metalloproteinase 8 activity. *Surgery* 2005; 138:313-20.
- Hayashi H, Sakai T. Animal models for the study of liver fibrosis: new insights from knockout mouse models. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 300:729-38.
- He SH. Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2004; 10:309-18.
- Heinrich S, Georgiev P, Weber A, Vergopoulos A, Graf R, Clavien P-A. Partial bile duct ligation in mice: A novel model of acute cholestasis. *Surgery* 2011; 149:445-51.
- Henderson NC, Iredale JP. Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. *Clin Sci (Lond)* 2007; 112:265-80.
- Hirschfield GM, Heathcote EJ, Gershwin ME. Pathogenesis of cholestatic liver disease and therapeutic approaches. *Gastroenterology* 2010; 139:1481-96.
- Holt AP, Salmon M, Buckley CD, Adams DH. Immune interactions in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 861-2.
- Hong YK, Detmar M. Prox 1, master regulator of the lymphatic vasculature phenotype. *Cell Tissue Res.* 2003; 314:85-92.

- Hosoda Y, Miyano T, Fujimoto T. Assay of gamma-glutamyl-transpeptidase activity in amniotic fluid offers a posible prenatal diagnosis of biliary atresia in the rat model. *Prenat Diagn.* 1997; 17: 9-12.
- Howard CV, Reed MG. Unbiased Stereology: three-dimensional measurement in microscopy. *Trends in Neurosciences.* 1998; 22:94-95.
- Howard CV, Reed MG. Unbiased Stereology: three-dimensional measurement in microscopy. 2nd ed. Oxford: Bios Scientific Publishers 2005.
- Huang YT, Hsu YC, Chen J, Liu CT, Wei YH. Oxidative-stress-related changes in the livers of bile-duct-ligated rats. *J Biomed Sci* 2003; 10:170-8.
- Huang LT, Chen CC, Sheen JM, Chen YJ, Hsieh CS, Tain YL. The interaction between high ammonia diet and bile duct ligation in developing rats: assessment by spatial memory and asymmetric dimethylarginine. *Int J Dev Neurosci* 2010; 28:169-74.
- Huang P, Liu D, Gan X, Zhang R, Gao W, Xia Z, Hei Z. Mast cells activation contribute to small intestinal ischemia reperfusion induced acute lung injury in rats. *Injury* 2012; 43:1250-6.
- Ikejima K, Takei Y, Honda H, Hirose M, Yoshikawa M, Zhang YJ, Lang T, Fukuda T, Yamashina S, Kitamura T, Sato N. Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology* 2002; 122:1399-410.
- Imamura M, Ogawa T, Sasaguri Y, Chayama K, Ueno H. Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats. *Gastroenterology* 2005; 128:138-46.
- Ingoldby CJ, McPherson GA, Blumgart LH. Endotoxemia in human obstructive jaundice. Effect of polymyxin B. *Am J Surg* 1984; 147:766-71.
- Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest* 2007; 117:539-48.
- Isayama F, Hines IN, Kremer M, Milton RJ, Byrd CL, Perry AW, McKim SE, Parsons C, Rippe RA, Wheeler MD. LPS signaling enhances hepatic fibrogenesis caused by experimental cholestasis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290:G1318-28.
- Iwakiri Y, Grosszmann RJ. The hyperdynamic circulation of chronic liver disease: from the patient to the molecule. *Hepatology* 2006; 43:S121-31.
- Jacob G, Nassar N, Hayam G, Ben-Haim S, Edoute Y, Better OS, Bomzon A. Cardiac function and responsiveness to beta-adrenoceptor agonists in rats with obstructive

- jaundice. *Am J Physiol* 1993; 265:G314-20.
- Jensen EB, Sundberg R. Statistical models for stereological inference about spatial structures: On the applicability of best linear unbiased estimators in stereology. *Biometrics*. 1986; 42:735-751.
 - Jeong WI, Lee CS, Park SJ, Chung JY, Jeong KS. Kinetics of macrophages, myofibroblasts and mast cells in carbon tetrachloride-induced rat liver cirrhosis. *Anticancer Res*. 2002; 22:869-77.
 - Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007; 23:435-61.
 - Joubert CJ. Principles of care and management in a laboratory animal facility. *J S Afr Vet Assoc*. 1978; 49:153-4.
 - Karatepe O, Acet E, Battal M, Adas G, Kemik A, Altiok M, Kamali G, Koculu S, Catay A, Kamali S, Karahan S. Effects of glutamine and curcumin on bacterial translocation in jaundiced rats. *World J Gastroenterol* 2010; 16:4313-20.
 - Kassel KM, Sullivan BP, Luyendyk JP. Lipopolysaccharide enhances transforming growth factor β 1-induced platelet-derived growth factor-B expression in bile duct epithelial cells. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27:714-21.
 - Katsuda T, Kurata H, Tamai R, Banas A, Ishii T, Ishikawa S, Ochiya T. The in vivo evaluation of the therapeutic potential of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for acute liver disease. *Methods Mol Biol*. 2014; 1213:57-67.
 - Katsuta Y, Zhang XJ, Ohsuga M, Akimoto T, Komeichi H, Shimizu S, Inami T, Miyamoto A, Satomura K, Takano T. Hemodynamic features of advanced cirrhosis due to chronic bile duct ligation. *J Nihon Med Sch* 2005; 72:217-25.
 - Kennett EC, Davies MJ. Degradation of matrix glycosaminoglycans by peroxynitrite/peroxynitrous acid: evidence for a hydroxyl-radical-like mechanism. *Free Radic Biol Med* 2007; 42:1278-89.
 - Kershenovich Stalnikowitz D, Weissbrod AB. Liver fibrosis and inflammation. A review. *Ann Hepatol* 2003; 2:159-63.
 - Kilicoglu B, Gencay C, Kismet K, Serin Kilicoglu S, Erguder I, Erel S, Sunay AE, Erdemli E, Durak I, Akkus MA. The ultrastructural research of liver in experimental obstructive jaundice and effect of honey. *Am J Surg* 2008; 195:249-56.
 - Kim H, Kataru RP, Koh GY. Regulation and implications of inflammatory lymphangiogenesis. *Trends Immunol*. 2012; 33:353-356.
 - Kinet JP. The essential role of mast cells in orchestrating inflammation. *Immunol Rev*

2007; 217:5-7.

- Kinnman N, Housset C. Peribiliary myofibroblasts in biliary type liver fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7:d496-503.
- Kirkland JG, Godfrey CB, Garrett R, Kakar S, Yeh BM, Corvera CU. Reversible surgical model of biliary inflammation and obstructive jaundice in mice. *J Surg Res* 2010; 164:221-7.
- Koellensperger E, Niesen W, Kolbenschlag J, Gramley F, Germann G, Leimer U. Human adipose tissue derived stem cells promote liver regeneration in a rat model of toxic injury. *Stem Cells International*. 2013; 534263,2013.
- Kojima K, Hosokawa M, Kobayashi K, Tainaka H, Chiba K. Microarray analysis of hepatic gene expression during long-term cholestasis induced by common bile duct ligation in rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2004; 115-116:63-75.
- Kolios G, Valatas V, Kouroumalis E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12:7413-20.
- Kondo S, Kagami S, Kido H, Strutz F, Müller GA, Kuroda Y. Role of mast cell tryptase in renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:1668-76.
- Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 1984; 65:305-11
- Kramer HJ. Impaired renal function in obstructive jaundice: roles of the thromboxane and endothelin systems. *Nephron* 1997; 77:1-12
- Kruglov EA, Nathanson RA, Nguyen T, Dranoff JA. Secretion of MCP-1/CCL2 by bile duct epithelia induces myofibroblastic transdifferentiation of portal fibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006; 290:G765-71.
- Kuhlmann WD, Peschke P. Hepatic progenitor cells, stem cells, and AFP expression in models of liver injury. *Int J Exp Pathol* 2006; 87:343-59.
- Kurz H, Burri PH, Djonov VG. Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function. *News Physiol Sci* 2003; 18:65-70.
- Kvietys PR, Granger DN. Role of intestinal lymphatics in interstitial volume regulation and transmucosal water transport. *Ann N Y Acad Sci*. 2010; 1207:E29-E43.
- LaBella FS, Brandes LJ. Interaction of histamine and other bioamines with cytochromes P450: implications for cell growth modulation and chemopotentialization by drugs. *Semin Cancer Biol* 2000; 10:47-53.
- Laschke MW, Dold S, Jeppsson B, Schilling MK, Menger MD, Thorlacius H. Rho-kinase inhibitor attenuates cholestasis-induced CXC chemokine formation, leukocyte

- recruitment, and hepatocellular damage in the liver. *J Surg Res* 2010; 159:666-73.
- Lauth WW. Relationship between hepatic blood flow and overall metabolism: the hepatic arterial buffer response. *Fed Proc* 1983; 42:1662-6.
 - Lazaridis KN, Strazzabosco M, Larusso NF. The cholangiopathies: disorders of biliary epithelia. *Gastroenterology* 2004; 127:1565-77.
 - Lee J, Gray A, Yuan J, Luoh SM, Avraham H, Wood WI. Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flr4. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93:1988-1992.
 - Lee JK, Whittaker SJ, Enns RA, Zetler P. Gastrointestinal manifestations of systemic mastocytosis. *World J Gastroenterol* 2008; 14:7005-7008.
 - Lee JH, Lee KH, Kim MH, Kim JP, Lee SJ, Yoon J. Possibility of undifferentiated human thigh adipose stem cells differentiating into functional hepatocytes. *Arch Plast Surg*. 2012; 39:593-599.
 - Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011; 25:195-206.
 - Leonhardt J, Kuebler JF, Turowski C, Tschernig T, Geffers R, Petersen C. Susceptibility to experimental biliary atresia linked to different hepatic gene expression profiles in two mouse strains. *Hepatol Res* 2010; 40:196-203.
 - Levy R, Schlaeffer F, Keynan A, Nagauker O, Yaari A, Sikuler E. Increased neutrophil function induced by bile duct ligation in a rat model. *Hepatology* 1993; 17:908-14.
 - Li MK, Crawford JM. The pathology of cholestasis. *Semin Liver Dis* 2004; 24:21-42.
 - Li T, Yang Z. Research progress of vasculopathy in portal hypertension. *World J Gastroenterol* 2005; 11:6079-84.
 - Li WG, Hu SX, Xue BD, Jiang ZG, Huang ZQ. Observation of hepatohilar peribiliary vascular plexus with complete absence of hepatic artery blood supply in rats. *Transplant Proc* 2007; 39:3424-8.
 - Lin CS, Lin G, Lue TF. Allogeneic and xenogeneic transplantation of adipose-derived stem cells in immunocompetent recipients without immunosuppressants. *Stem Cells and Dev*. 2012; 21:2770-2778.
 - Lin Y, Chen X, Yan Z, Liu L, Tang W, Zheng X, Li Z, Qiao J, Li S, Tian W. Multilineage differentiation of adipose-derived stromal cells from GFP transgenic mice. *Mol Cell Biochem* 2006; 285:69-78.
 - Lipsett PA, Pitt HA. Acute cholangitis. En: *Biliary Tract Surgery*. Ed. Pitt HA. *Surgical Clinical of North America* 1990; 70:1297-312.

- Liu Z, Sakamoto T, Yokomuro S, Ezure T, Subbotin V, Murase N, Contrucci S, Demetris AJ. Acute obstructive cholangiopathy in interleukin-6 deficient mice: compensation by leukemia inhibitory factor (LIF) suggests importance of gp-130 signaling in the ductular reaction. *Liver* 2000; 20:114-24.
- Löffek S, Schilling O, Franzke CW. Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur Respir J* 2011; 38:191-208.
- Lokmic Z, Mitchell GM. Visualization and stereological assessment of blood and lymphatic vessels. *Histol Histopathol.* 2011; 26:781-796.
- López L, Begega A, Arias JL, Lorente L, Aller MA, Durán Poveda M, Arias J. Citocromo Oxidasa Hepática en Ratas con Colestasis Microquirúrgica y con Anastomosis Portocava. *Rev Esp Enferm Dig* 1999; 91:365-73.
- Lorente L, Aller MA, Duran HJ, Cejalvo D, Lloris JM, Arias J. Extrahepatic biliary anatomy in Wistar rats. *Surg Res Comm* 1995; 17:31-38.
- Lorente L, Aller MA, Arias J. Liver Anatomy. En: *Microsurgery In Liver Research*, Aller MA, Arias J. Eds. Bentham Scientific publishers, 2009, pp 99-107.
- Lu BR, Mack CL. Inflammation and biliary tract injury. *Curr Opin Gastroenterol* 2009; 25:260-4.
- Lu BR, Brindley SM, Tucker RM, Lambert CL, Mack CL. Alpha-enolase autoantibodies cross-reactive to viral proteins in a mouse model of biliary atresia. *Gastroenterology* 2010; 139:1753-61.
- Luis Santamaría, Ildefonso Ingelmo, Jesús Ruiz, Fernando Teba, Luis M. Herranz, Guillermo Montalbán, Rocío Martín, Javier Codesal, José M. Pozuelo, Rosario Rodríguez, Riánsares Arriazu. Stereological Estimate of the Length of Microvessels and the Number, Proliferation and Apoptosis of Endothelial Cells in Prostate Cancer. *The Open Prostate Cancer Journal.* 2009; 2:46-53
- Magen I, Avraham Y, Ackerman Z, Vorobiev L, Mechoulam R, Berry EM. Cannabidiol ameliorates cognitive and motor impairments in bile-duct ligated mice via 5-HT1A receptor activation. *Br J Pharmacol* 2010; 159:950-7.
- Mäkinen T, Normén C, Petrova TV. Molecular mechanisms of lymphatic vascular development. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64:1915-1929.
- Malesmud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci* 2006; 11:1696-701.
- Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two

- deaths? *Hepatology* 2006; 43:S31-44.
- Mani AR, Nahavandi A, Moosavi M, Safarinejad R, Dehpour AR. Dual nitric oxide mechanisms of cholestasis-induced bradycardia in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002; 29:905-8.
 - Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2011; 11:519-31.
 - Mareel M, Leroy A. Clinical, cellular and molecular aspects of cancer invasions. *Physiol Rev.* 2003; 83:337-376.
 - Martinez-Corral I, Olmeda D, Dieguez-Hurtado R, Tammela T, Alitalo K, Ortega S. In vivo imaging of lymphatic vessels in development, wound healing, inflammation, and tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109:6223-6228.
 - Marzioni M, Glaser S, Francis H, Marucci L, Benedetti A, Alvaro D, Taffetani S, Ueno Y, Roskams T, Phinzy JL, Venter J, Fava G, Lesage GD, Alpini G. Autocrine/paracrine regulation of the growth of the biliary tree by the neuroendocrine hormone serotonin. *Gastroenterology* 2005; 128:121-37.
 - Marzioni M, Francis H, Benedetti A, Ueno Y, Fava G, Venter J, Reichenbach R, Mancino MG, Summers R, Alpini G, Glaser S. Ca²⁺-dependent cytoprotective effects of ursodeoxycholic and tauroursodeoxycholic acid on the biliary epithelium in a rat model of cholestasis and loss of bile ducts. *Am J Pathol* 2006; 168:398-409.
 - Marzioni M, Alpini G, Saccomanno S, Candelaresi C, Venter J, Rychlicki C, Fava G, Francis H, Trozzi L, Glaser S, Benedetti A. Glucagon-like peptide-1 and its receptor agonist exendin-4 modulate cholangiocyte adaptive response to cholestasis. *Gastroenterology* 2007; 133:244-55.
 - Masyuk TV, Ritman EL, LaRusso NF. Quantitative assessment of the rat intrahepatic biliary system by three-dimensional reconstruction. *Am J Pathol.* 2001; 158:2079-88
 - Matsumoto Y, Niimoto S, Katayama K, Hirose K, Yamaguchi A, Torigoe K. Effects of biliary drainage in obstructive jaundice on microcirculation, phagocytic activity, and ultrastructure of the liver in rats. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002; 9:360-6.
 - Matsunaga Y, Kawasaki H, Terada T. Stromal mast cells and nerve fibers in various chronic liver diseases: relevance to hepatic fibrosis. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:1923-32.
 - Matsunaga Y, Terada T. Mast cell subpopulations in chronic inflammatory hepatobiliary diseases. *Liver* 2000; 20:152-6.
 - Mehta G, Gusto T, Mookerjee RP, et al. Inflammation and portal hypertension - the

- undiscovered country. *J Hepatol.* 2014; 61:155-163
- Meran S, Steadman R. Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis. *Int J Exp Pathol* 2011; 92:158-67.
 - Metz M, Maurer M. Mast cells--key effector cells in immune responses. *Trends Immunol* 2007; 28:234-41.
 - Metz M, Grimbaldston MA, Nakae S, Piliponsky AM, Tsai M, Galli SJ. Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation. *Immunol Rev* 2007b; 217:304-28.
 - Minter RM, Fan MH, Sun J, Niederbichler A, Ipaktchi K, Arbabi S, Hemmila MR, Remick DG, Wang SC, Su GL. Altered Kupffer cell function in biliary obstruction. *Surgery* 2005; 138:236-45.
 - Minter RM, Bi X, Ben-Josef G, Wang T, Hu B, Arbabi S, Hemmila MR, Wang SC, Remick DG, Su GL. LPS-binding protein mediates LPS-induced liver injury and mortality in the setting of biliary obstruction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296:G45-54.
 - Miñano C, García-Tsao G. Clinical pharmacology of portal hypertension. *Gastroentrol Clin North Am* 2010; 39: 681-95.
 - Misra V, Misra SP, Dwivedi M, Gupta SC. Histomorphometric study of portal hypertensive enteropathy. *Am J Clin Pathol.* 1997; 108:652-657.
 - Miyoshi H, Rust C, Guicciardi ME, Gores GJ. NF-kappaB is activated in cholestasis and functions to reduce liver injury. *Am J Pathol.* 2001; 158:967-75.
 - Moazzam FN, Brems JJ, Yong SL, Filkins JP, Fisher SG, Holt DR, Gamelli RL, Ding JW. Endotoxin potentiates hepatocyte apoptosis in cholestasis. *J Am Coll Surg.* 2002; 194:731-9.
 - Moezi L, Shafaroodi H, Sarkar S, Emami-Razavi SH, Sanatkar M, Mirazi N, Dehpour AR. Involvement of nitrergic and opioidergic systems in the hypothermia induced by cholestasis in rats. *Pathophysiology.* 2006; 13:227-32
 - Molderings GJ. The genetic basis of mast cell activation disease - looking through a glass darkly. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2015; 93:75-89
 - Moquillaza LM, Aller MA, Nava MP, Santamaria L, Vergara P, Arias J. Partial hepatectomy, partial portal vein stenosis and mesenteric lymphadenectomy increase splanchnic mast cell infiltration in the rat. *Acta Histochem.* 2010; 112:372-382.
 - Mombeini T, Roushanzamir F, Jorjani M, Pourpak Z, Gaskari SA, Mehr SE, Dehpour AR. Alteration in specific opioid-receptor labeling on peripheral blood leukocytes of bile

- duct-ligated rat. *Pathophysiology* 2006; 13:111-7.
- Mori V, Bartoloni St Omer F. On the behavior of mast cells in experimental cholestatic hepatopathy caused by ligation of the common bile duct. *Arch De Vecchi Anat Patol* 1966; 47:1089-98.
 - Morgan WWJr, Rosenkrantz JC, Hill RBJr. Hepatic arterial interruption in the fetus. An attempt to stimulate biliary atresia. *J Pediatr Surg* 1966; 1: 342-6.
 - Mormone E, George J, Nieto N. Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. *Chem Biol Interact* 2011; 193:225-31.
 - Morwood SR, Nicholson LB. Modulation of the immune response by extracellular matrix proteins. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2006; 54:367-74.
 - Muddu AK, Guha IN, Elsharkawy AM, Mann DA. Resolving fibrosis in the diseased liver: translating the scientific promise to the clinic. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39:695-714.
 - Nahavandi A, Dehpour AR, Mani AR, Homayounfar H, Abdoli A, Abdolhoseini MR. The role of nitric oxide in bradycardia of rats with obstructive cholestasis. *Eur J Pharmacol* 2001; 411:135-141.
 - Nakanuma Y, Yasoshima M, Tsuneyama K, Harada K. Histopathology of primary biliary cirrhosis with emphasis on expression of adhesion molecules. *Semin Liver Dis* 1997; 17:35-47.
 - Nakamura A, Yamazaki K, Suzuki K, Sato S. Increased portal tract infiltration of mast cells and eosinophils in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1997; 92:2245-9.
 - Nakamura K, Tanoue A. Etiología of biliary atresia as a developmental anomaly: recent advances. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2013; 20:459-64.
 - Nanji AA, Jokelainen K, Rahemtulla A, Miao L, Fogt F, Matsumoto H, Tahan SR, Su GL. Activation of nuclear factor kappa B and cytokine imbalance in experimental alcoholic liver disease in the rat. *Hepatology* 1999; 30:934-43.
 - Nelson L, Vergnolle N, D'Mello C, Chapman K, Le T, Swain MG. Endogenous opioid-mediated antinociception in cholestatic mice is peripherally, not centrally, mediated. *J Hepatol* 2006; 44:1141-9.
 - Newby DE, Hayes PC. Hyperdynamic circulation in liver cirrhosis: not peripheral vasodilatation but "splanchnic steal". *Q J Med* 2002; 95: 827-30.
 - Ng CP, Swartz MA. Mechanisms of Interstitial Flow-Induced Remodeling of Fibroblast–Collagen Cultures. *Ann Biomed Engin* 2006; 34: 446-454.

- Oben JA, Roskams T, Yang S, Lin H, Sinelli N, Torbenson M, Smedh U, Moran TH, Li Z, Huang J, Thomas SA, Diehl AM. Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters. *Gut* 2004; 53:438-45.
- Ogawa T, Suruga K, Kojima Y, Kitahara T, Kuwabara N. Experimental study of the pathogenesis of infantile obstructive cholangiopathy and its clinical evaluation. *J Pediatr Surg* 1983; 18:131-5.
- Oguz S, Kanter M, Erboga M, Erenoglu C. Protective effects of thymoquinone against cholestatic oxidative stress and hepatic damage after biliary obstruction in rats. *J Mol Histol* 2012; 43:151-9.
- Ohara N, Schaffner T, Reichen J. Structure-function relationship in secondary biliary cirrhosis in the rat. Stereologic and hemodynamic characterization of a model. *J Hepatol* 1993; 17:155-62.
- Omenetti A, Popov Y, Jung Y, Choi SS, Witek RP, Yang L, Brown KD, Schuppan D, Diehl AM. The hedgehog pathway regulates remodelling responses to biliary obstruction in rats. *Gut* 2008a; 57:1275-82.
- Omenetti A, Porrello A, Jung Y, Yang L, Popov Y, Choi SS, Witek RP, Alpini G, Venter J, Vandongen HM, Syn WK, Baroni GS, Benedetti A, Schuppan D, Diehl AM. Hedgehog signaling regulates epithelial-mesenchymal transition during biliary fibrosis in rodents and humans. *J Clin Invest* 2008b; 118:3331-42.
- Omenetti A, Bass LM, Anders RA, Clemente MG, Francis H, Guy CD, McCall S, Choi SS, Alpini G, Schwarz KB, Diehl AM, Whittington PF. Hedgehog activity, epithelial-mesenchymal transitions, and biliary dysmorphogenesis in biliary atresia. *Hepatology* 2011a; 53:1246-58.
- Omenetti A, Diehl AM. Hedgehog signaling in cholangiocytes. *Curr Opin Gastroenterol* 2011b; 27:268-75.
- O'Neil S, Hunt J, Filkins J, Gamelli R. Obstructive jaundice in rats results in exaggerated hepatic production of tumor necrosis factor-alpha and systemic and tissue tumor necrosis factor-alpha levels after endotoxin. *Surgery* 1997; 122:281-6.
- Orellana M, Avalos N, Abarca M, Valdés E. Microsomal and peroxisomal fatty acid oxidation in bile duct ligated rats: a comparative study between liver and kidney. *Gen Pharmacol* 1997; 28:525-9.
- Park SM. The crucial role of cholangiocytes in cholangiopathies. *Gut Liver* 2012; 6:295-304.
- Parola M, Pinzani M. Hepatic wound repair. *Fibrogenesis and Tissue Repair* 2009; 2:

4.

- Patsenker E, Popov Y, Stickel F, Jonczyk A, Goodman SL, Schuppan D. Inhibition of integrin α v β 6 on cholangiocytes blocks transforming growth factor- β activation and retards biliary fibrosis progression. *Gastroenterology* 2008; 135:660-70.
- Petersen C. Biliary atresia: the animal models. *Semin Pediatr Surg* 2012; 21:185-91.
- Pepper MS, Skobe M. Lymphatic endothelium: morphological, molecular and functional properties. *J Cell Biology*. 2013; 163:209-213.
- Peters T Jr. Proposals for standardization of total protein assays. *Clin Chem* 1968; 14:1147-59.
- Petersen C. Biliary atresia: The animal models. *Semin Pediatr Surg* 2012; 21:185-91.
- Phillips PA, Keast D, Papadimitriou JM, Walters MN, Stanley NF. Chronic obstructive jaundice induced by reovirus type 3 in weaning mice. *Pathology* 1969; 1:193-203.
- Pinzani M, Rosselli M, Zuckermann M. Liver cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011; 25:281-90.
- Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol Aspects Med* 2000; 21:49-98.
- Polimeno L, Azzarone A, Zeng QH, Panella C, Subbotin V, Carr B, Bouzahzah B, Francavilla A, Starzl TE. Cell proliferation and oncogene expression after bile duct ligation in the rat: Evidence of a specific growth effect on bile duct cells. *Hepatology* 1995; 21:1070-78.
- Poncelet AJ, Vercruysse J, Saliez A, Gianello P. Although pig allogeneic mesenchymal stem cells are not immunogenic in vitro, intracadiac injection elicits an immune response in vivo. *Transplantation*. 2007; 83:783-790.
- Porter LE, Elm MS, Van Thiel DH, Eagon PK. Hepatic estrogen receptor in human liver disease. *Gastroenterology* 1987; 92:735-45.
- Portincasa P, Grattagliano I, Testini M, Caruso ML, Wang DQ, Moschetta A, Calamita G, Vacca M, Valentini AM, Renna G, Lissidini G, Palasciano G. Parallel intestinal and liver injury during early cholestasis in the rat: modulation by bile salts and antioxidants. *Free Radic Biol Med* 2007; 42:1381-91.
- Poupon R, Chazouillères O, Poupon RE. Chronic cholestatic diseases. *J Hepatol* 2000; 32:129-40.
- Prieto I, Aller MA, Santamaría L, Nava MP, Madero R, Pérez-Robledo JP, Arias J. Prehepatic portal hypertension produces increased mast cell density in the small

- bowel and in mesenteric lymph nodes in the rat. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20:1025-31.
- Proell V, Carmona-Cuenca I, Murillo MM, Huber H, Fabregat I, Mikulits W. TGF-beta dependent regulation of oxygen radicals during transdifferentiation of activated hepatic stellate cells to myofibroblastoid cells. *Comp Hepatol* 2007; 6:1.
 - Quraishy MS, Chescoe D, Mullervy J, Coates M, Hinton RH, Bailey ME. Influence of the gut microflora and of biliary constituents on morphological changes in the small intestine in obstructive jaundice. *HPB Surgery*. 1996; 10:11-20.
 - Rahimi RS, Rockey DC. Complications and outcomes in chronic liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2011; 27:204-9.
 - Ramadori G, Saile B. Portal tract fibrogenesis in the liver. *Lab Invest* 2004a; 84:153-9.
 - Ramadori G, Saile B. Inflammation, damage repair, immune cells, and liver fibrosis: specific or nonspecific, this is the question. *Gastroenterology* 2004b; 127:997-1000.
 - Ramm GA, Carr SC, Bridle KR, Li L, Britton RS, Crawford DH, Vogler CA, Bacon BR, Tracy TF. Morphology of liver repair following cholestatic liver injury: resolution of ductal hyperplasia, matrix deposition and regression of myofibroblasts. *Liver* 2000; 20:387-96.
 - Ray P, Krishnamoorthy N, Oriss TB, Ray A. Signaling of c-kit in dendritic cells influences adaptive immunity. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1183:104-122.
 - Reynolds BM, Dargan EL. Acute obstructive cholangitis: A distinct clinical syndrome. *Ann Surg* 1959; 150:299-303.
 - Reynoso-Paz S, Coppel RI, Mackay JR, Bass NM, Ansari AA, Gershwin ME. The immunobiology of bile and biliary epithelium. *Hepatology* 1999; 30: 351-7.
 - Rhodes JM, Simons M. The extracellular matrix and blood vessel formation: not just a scaffold. *J Cell Mol Med* 2007; 11:176-205.
 - Rimola A, Soto R, Bory F, Arroyo V, Piera C, Rodes J Reticuloendothelial system phagocytic activity in cirrhosis and its relation to bacterial infection and prognosis. *Hepatology* 1984; 4:53-8.
 - Rioux KP, Wallace JL. Long-term antigen challenge results in progressively diminished mucosal mast cell degranulation in rats. *Gastroenterology* 1996; 111:1516-23.
 - Roberts SK, Ludwig J, Larusso NF. The pathobiology of biliary epithelia. *Gastroenterology* 1997; 112:269-79.
 - Rockey DC. Hepatic fibrosis, stellate cells, and portal hypertension. *Clin Liver Dis* 2006; 10:459-79.

- Rodríguez J. Anestesia. En: Trasplante experimental de órganos. Arias J, Aller MA, Lorente L, Rodríguez J, De Pedro JA, Brandau D, Durán H. Eds. Garsi SA, Madrid, 1989; pp 65-68.
- Roeb E, Purucker E, Breuer B, Nguyen H, Heinrich PC, Rose-John S, Matern S. TIMP expression in toxic and cholestatic Liver injury in rat. *J Hepatol* 1997; 27:535-44.
- Rondonotti E, Villa F, Signorelli C, de Francis R. Portal hypertensive enteropathy. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 2006; 16:277-286.
- Saavedra Y, Vergara P. Somatostatin inhibits intestinal mucosal mast cell degranulation in normal conditions and during mast cell hyperplasia. *Regul Pept* 2003; 111:67-75.
- Saito JM, Maher JJ. Bile duct ligation in rats induces biliary expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant. *Gastroenterology* 2000; 118:1157-68.
- Saidi RF, Rajeshkumar B, Shariftabrizi A, Bogdanov AA, Zheng S, Dresser K, Walter O. Human adipose-derived mesenchymal stem cells attenuate liver ischemia-reperfusion injury and promote liver regeneration. *Surgery*. 2014; 156:1225-1231.
- Salerno F, Guevara M, Bernardi M, Moreau R, Wong F, Angeli P, Garcia-Tsao G, Lee SS. Refractory ascites: pathogenesis, definition and therapy of a severe complication in patients with cirrhosis. *Liver Int*. 2010; 30:937-47
- Sánchez-Patán F, Anchuelo R, Aller MA, Vara E, García C, Nava MP, Arias J. Chronic prehepatic portal hypertension in the rat: is it a type of metabolic inflammatory syndrome? *Lipids Health Dis* 2008a; 7:4.
- Sanchez-Patan F, Anchuelo R, Corcuera MT, et al. Biliary fibrosis in microsurgical extrahepatic cholestasis in the rat. *Microsurgery*. 2008b; 28:361-366
- Schaffner F, Popper H. Classification and mechanism of cholestasis. En: *Liver and Biliary Disease. Pathophysiology, Diagnosis, Management*. Editado por Wright R, Alberti KGMM, Karran S, Millward-Sadler GH. London. Oxford: WB Saunders Company Ltd. 1979; 296-323.
- Schneider E, Leite-de-Moraes M, Dy M. Histamine, immune cells and autoimmunity. *Adv Exp Med Biol* 2011; 709:81-94.
- Schulte-Merker S, Sabine A, Petrova TV. Lymphatic vascular morphogenesis in development, physiology, and disease. *J Cell Biol*. 2011; 193:607-618.
- Sedlacek N, Jia JD, Bauer M, Herbst H, Ruehl M, Hahn EG, Schuppan D. Proliferating bile duct epithelial cells are a major source of connective tissue growth factor in rat biliary fibrosis. *Am J Pathol* 2001; 158:1239-44.

- Seki A, Sakai Y, Komura T, Nasti A, Yoshida K, Higashimoto M, Honda M, Usui S, Takamura M, Takamura T, Ochiya T, Furuichi K, Wada T, Kaneko S. Adipose tissue-derived stem cells as a regenerative therapy for a mouse steatohepatitis-induced cirrhosis model. *Hepatology*. 2013; 58:1133-1142.
- Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 328:258-264.
- Sherlock S. Cholestasis. En: *Diseases of the Liver and Biliary System*. Ed. Sherlock S. Blackwell Scientific Publications. London 1989; 8ª Edición. Chapter 13; pp.248-272.
- Shi Y, Hu G, Su J, Li W, Chen Q, Shou P, Xu C, Chen X, Huang Y, Zhu Z, Huang X, Han X, Xie N, Ren G. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Rev*. 2010; 20:510-518.
- Shin K, Lee SH. Interplay between inflammatory response and lymphatic vessels. *Immune Networks*. 2014; 14:182-186.
- Shivakumar P, Campbell KM, Sabla GE, Miethke A, Tiao G, McNeal MM, Ward RL, Bezerra JA. Obstruction of extrahepatic bile ducts by lymphocytes is regulated by IFN-gamma in experimental biliary atresia. *J Clin Invest* 2004; 114:322-9.
- Sicklick JK, Choi SS, Bustamante M, McCall SJ, Pérez EH, Huang J, Li YX, Rojkind M, Diehl AM. Evidence for epithelial-mesenchymal transitions in adult liver cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291:G575-83.
- Sigal M, Siebert N, Zechner D, Menschikow E, Abshagen K, Vollmar B, Eipel C. Darbepoetin- α inhibits the perpetuation of necro-inflammation and delays the progression of cholestatic fibrosis in mice. *Lab Invest* 2010; 90:1447-56.
- Singer NG, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol*. 2011; 6:457-478.
- Sipeki N, Antal-Szalmas P, Lakatos PL, Papp M. Immune dysfunction in cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2014; 20:2564-2577.
- Slott PA, Liu MH, Tavoloni N. Origin, pattern, and mechanism of bile duct proliferation following biliary obstruction in the rat. *Gastroenterology* 1990; 99:466-77.
- Soylu AR, Aydogdu N, Basaran UN, Altaner S, Tarcin O, Gedik N, Umit H, Tezel A, Dokmeci G, Baloglu H, Ture M, Kutlu K, Kaymak K. Antioxidants vitamin E and C attenuate hepatic fibrosis in biliary-obstructed rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12:6835-41.
- Spitz L. Ligation of the common bile duct in the fetal lamb: An experimental model

- for the study of biliary atresia. *Pediatr Res* 1980; 14:740-8.
- Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol* 2006; 85:699-715.
 - Stevens RL, Adachi R. Protease-proteoglycan complexes of mouse and human mast cells and importance of their beta-tryptase-heparin complexes in inflammation and innate immunity. *Immunol Rev* 2007; 217:155-167.
 - Streckbein P, Jäckel S, Malik CY, Obert M, Kähling C, Wilbrand JF, Zahner D, Heidinger K, Kampschulte M, Pons-Kühnemann J, Köhler K, Sauer H, Kramer M. Reconstruction of critical-size mandibular defects in immunoincompetent rats with human adipose-derived stromal cells. *J Craniomaxillofac Surg.* 2013; 41:496-503.
 - Suarez V, Puerta A, Santos LE, Perez JM, Varon A, Botero RC. Portal hypertensive biliopathy: A single center experience and literatura review. *World J Hepatol* 2013; 5:137-44.
 - Sugihara A, Tsujimura T, Fujita Y, Nakata Y, Terada N. Evaluation of role of mast cells in the development of liver fibrosis using mast cell-deficient rats and mice. *J Hepatol* 1999; 30:859-67.
 - Sutton MT, Bonfield TL. Stem cells: Innovation in clinical applications. *Stem Cells Int.* 2014; 2014:516278.
 - Syal G, Fausther M, Dranoff JA. Advances in cholangiocyte immunobiology. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; 303:G1077-86.
 - Szabó E, Lódi C, Korpos E, Batmunkh E, Rottenberger Z, Deák F, Kiss I, Tokés AM, Lotz G, László V, Kiss A, Schaff Z, Nagy P. Expression of matrilin-2 in oval cells during rat liver regeneration. *Matrix Biol* 2007; 26:554-60.
 - Sztrymf B, Rabiller A, Nunes H, Savale L, Lebrec D, Le Pape A, de Montpreville V, Mazmanian M, Humbert M, Hervé P. Prevention of hepatopulmonary syndrome and hyperdynamic state by pentoxifylline in cirrhotic rats. *Eur Respir J* 2004; 23:752-8.
 - Sztrymf B, Libert JM, Mougeot C, Lebrec D, Mazmanian M, Humbert M, Herve P. Cirrhotic rats with bacterial translocation have higher incidence and severity of hepatopulmonary syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20:1538-44.
 - Tacke F, Luedde T, Trautwein C. Inflammatory pathways in liver homeostasis. *Clin Rev Allerg Immunol* 2009; 36:4-12.
 - Tahan G, Tarcin O, Tahan V, Eren F, Gedik N, Sahan E, Biberoglu N, Guzel S, Bozbas A, Tozun N, Yucel O. The effects of N-acetylcysteine on bile duct ligation-induced liver fibrosis in rats. *Dig Dis Sci* 2007; 52:3348-54.

- Takeshita A, Shibayama Y. Role of mast cells in hepatic remodeling during cholestasis and its resolution: relevance to regulation of apoptosis. *Exp Toxicol Pathol* 2005; 56:273-80.
- Tammela T, Alitalo K. Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell*. 2010; 140:460-476.
- Tandon B, Garcia-Tsao G. Bacterial infection, sepsis and multiorgan failure in cirrhosis. *Sem Liver Dis* 2008; 28:26-42.
- Tanaka Y, Chen C, Maher JM, Klaassen CD. Kupffer cell-mediated downregulation of hepatic transporter expression in rat hepatic ischemia-reperfusion. *Transplantation* 2006; 82:258-66.
- Thabut D, Tazi KA, Bonnefont-Rousselot D, Aller M, Farges O, Guimont MC, Tellier Z, Guichard C, Ogier-Denis E, Poynard T, Moreau R, Lebrec D. High-density lipoprotein administration attenuates liver proinflammatory response, restores liver endothelial nitric oxide synthase activity, and lowers portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology* 2007; 46:1893-906.
- Thabut D, Massard J, Gangloff A, Carbonell N, Francoz C, Nguyen-Khac E, Duhamel C, Lebrec D, Poynard T, Moreau R. Model for end-stage liver disease score and systemic inflammatory response are major prognostic factors in patients with cirrhosis and acute functional renal failure. *Hepatology* 2007; 46:1872-82.
- Theoharides TC, Alysandratos KD, Angelidou A, Delivanis DA, Sismanopoulos N, Zhang B, Asadi S, Vasiadi M, Weng Z, Miniati A, Kalogeromitros D. Mast cells and inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1822:21-33.
- Toki F, Takahashi A, Suzuki M, Ootake S, Hirato J, Kuwano H. Development of an experimental model of cholestasis induced by hypoxic/ischemic damage to the bile duct and liver tissues in infantile rats. *J Gastroenterol* 2011; 46:639-47.
- Tsuji W, Rubin JP, Marra KG. Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration. *World J Stem Cells*. 2014; 6:312-321.
- Usunier B, Benderitter M, Tamarta R, Chapel A. Management of fibrosis: The mesenchymal stromal cells breakthrough. *Stem Cell Int*. 2014; 340257;2014.
- Valent P. Mast cell activation syndromes: definition and classification. *Allergy*. 2013; 68:417-24.
- Valent P, Sillaber C, Baghestanian M, Bankl HC, Kiener HP, Lechner K, Binder BR. What have mast cells to do with edema formation, the consecutive repair and fibrinolysis? *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 115:2-8.

- Van den Heuvel MC, Gouw AS, Boot M, Slooff MJ, Poppema S, de Jong KP. The finest branches of the biliary tree might induce biliary vascularization necessary for biliary regeneration. *J Hepatol* 2006; 44:947-55.
- Van Steenkiste C, Trachet B, Casteleyn C, van Loo D, Van Hoorebeke L, Segers P, Geerts A, Van Vlierberghe H, Colle I. Vascular corrosion casting: analyzing wall shear stress in the portal vein and vascular abnormalities in portal hypertensive and cirrhotic rodents. *Lab Invest* 2010; 90:1558-72.
- Varma MJ, Breuls RG, Schouten TE, Jurgens WJ, Bontkes HJ, Schuurhuis GJ, van Ham SM, van Milligen FJ. Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Dev* 2007; 16:91-104.
- Viggiano TR, Gostout CJ. Portal hypertensive intestinal vasculopathy: a review of the clinical, endoscopic and histopathologic features. *Am J Gastroenterol.* 1992; 87:944-954.
- Vliagoftis H, Befus AD. Mast cells at mucosal frontiers. *Curr Mol Med* 2005; 5:573-89.
- Wakabayashi Y, Shimizu H, Kimura F, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Miyazaki M. Mechanism of neutrophil accumulation in sinusoids after extrahepatic biliary obstruction. *Hepatogastroenterology* 2008; 55:1179-83.
- Wang G, Shen H, Rajaraman G, Roberts MS, Gong Y, Jiang P, Burczynski F. Expression and antioxidant function of liver fatty acid binding protein in normal and bile-duct ligated rats. *Eur J Pharmacol* 2007; 560:61-8.
- Wang CC, Lin JW, Lee LM, Lin CM, Chiu WT, Pai HT, Hung KS. Alpha-melanocyte-stimulating hormone gene transfer attenuates inflammation after bile duct ligation in the rat. *Dig Dis Sci* 2008; 53:556-63.
- Welle M. Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *J Leukoc Biol* 1997; 61:233-45.
- Wernersson S, Pejler G. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat Rev Immunol.* 2014; 14:478-94.
- Wiesner RH. Long-term comparison of tacrolimus versus cyclosporine in liver transplantation. The US States FK Study Group. *Transplantation Proc.* 1998; 30:1399-1400.
- Winau F, Quack C, Darmoise A, Kaufmann SH. Starring stellate cells in liver immunology. *Curr Opin Immunol* 2008; 20:68-74.
- Witte CL, Witte MH, Dumont AE. Lymph imbalance in the genesis and perpetuation

- of the ascites syndrome in hepatic cirrhosis. *Gastroenterology*. 1980; 78:1059-1068.
- Wong GW, Zhuo L, Kimata K, Lam BK, Satoh N, Stevens RL. Ancient origin of mast cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 451:314-318.
 - Woolf GM, Vierling JM. Disappearing intrahepatic bile ducts: the syndromes and their mechanisms. *Semin Liver Dis* 1993; 13:261-75.
 - Xia X, Francis H, Glaser S, Alpini G, LeSage G. Bile acid interactions with cholangiocytes. *World J Gastroenterol* 2006; 12:3553-63.
 - Yagi R, Zhu J, Paul WE. An updated view on transcription factor GATA3-mediated regulation of Th1 and Th2 cell differentiation. *Int Immunol* 2011; 23:415-20.
 - Yamashiro T, Watanabe N, Yokoyama KK, Koga C, Tsuruo T, Kobayashi Y. Requirement of expression of P-glycoprotein on human natural killer leukemia cells for cell-mediated cytotoxicity. *Biochem Pharmacol*. 1998; 55:1385-90.
 - Yang W, Benjamin IS, Moore K, Portmann B, Alexander B. The action of nitric oxide on hepatic haemodynamics during secondary biliary cirrhosis in the rat. *Eur J Pharmacol* 2003; 461:41-8.
 - Yang H, Li TW, Peng J, Tang X, Ko KS, Xia M, Aller MA. A mouse model of cholestasis-associated cholangiocarcinoma and transcription factors involved in progression. *Gastroenterology* 2011; 141:378-88.
 - Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima E, Sato K, Inoue K, Nagase T, Koshima I, Gonda K. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol* 2006; 208:64-76.
 - Yung S, Chan TM. Glycosaminoglycans and proteoglycans: overlooked entities? *Perit Dial Int* 2007; 27:S104-9.
 - Zandieh A, Payabvash S, Pasalar P, Morteza A, Zandieh B, Tavangar SM, Dehpour AR. Gadolinium chloride, a Kupffer cell inhibitor, attenuates hepatic injury in a rat model of chronic cholestasis. *Hum Exp Toxicol* 2011; 30:1804-10.
 - Zavadil J, Böttinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 2005; 24:5764-74.
 - Zhou S, Tan C, Dai Z, Zhu H, Xu M, Zhou Z, Wang W, Zhao Y, Fu X, Zhou J, Fan J. Tacrolimus enhances the invasion potential of hepatocellular carcinoma cells and promotes lymphatic metastasis in a rat model of hepatocellular carcinoma: involvement of vascular endothelial growth factor-C. *Transplant Proc*. 2011; 43:2747-2754.

- Zhu, J., Yamane, H. and Paul, W. E. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu. Rev. Immunol* 2010; 28:445-89.
- Zhu W, Shi XL, Xiao JQ, Gu GX, Ding YT, Ma ZL. Effects of xenogeneic adipose-derived stem cell transplantation on acute-on-chronic liver failure. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2013; 12:60-67.
- Zimmermann A, Zhao D, Reichen J. Myofibroblasts in the cirrhotic rat liver reflect hepatic remodeling and correlate with fibrosis and sinusoidal capillarization. *J Hepatol* 1999; 30:646-52.
- Zitka O, Kukacka J, Krizkova S, Huska D, Adam V, Masarik M, Prusa R, Kizek R. Matrix metalloproteinases. *Curr Med Chem* 2010; 17:3751-68.
- Zollner G, Wagner M, Fickert P, Geier A, Fuchsbichler A, Silbert D, Gumhold J, Zatloukal K, Kaser A, Tilg H, Denk H, Trauner M. Role of nuclear receptors and hepatocyte-enriched transcription factors for Ntcp repression in biliary obstruction in mouse liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289:G798-805.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7:211-28.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13:4279-95.